

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 9 月 1 日 (01.09.2005)

PCT

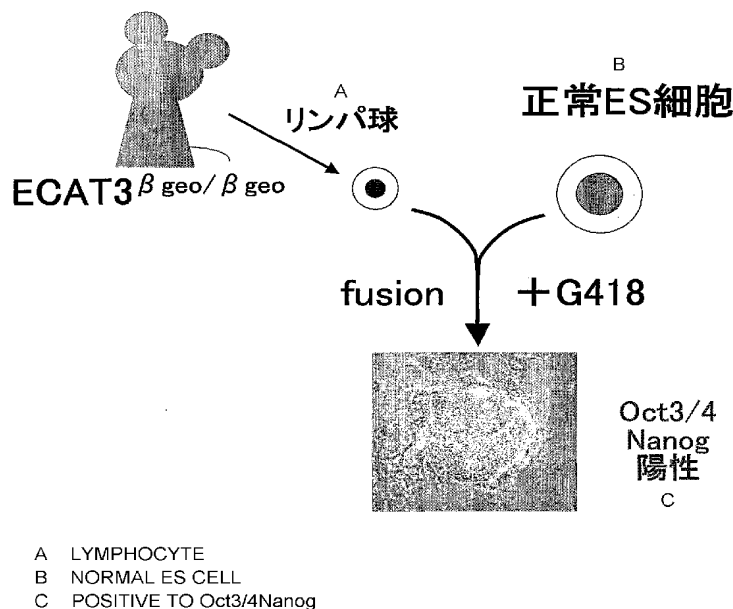
(10) 国際公開番号  
WO 2005/080598 A1

- (51) 国際特許分類: C12Q 1/68, 1/02, C12N 5/10, A01K 67/027, G01N 33/50, 33/15
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/002842
- (22) 国際出願日: 2005 年 2 月 16 日 (16.02.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2004-042337 2004 年 2 月 19 日 (19.02.2004) JP  
特願2004-232961 2004 年 8 月 10 日 (10.08.2004) JP  
特願2004-276572 2004 年 9 月 24 日 (24.09.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 住友製薬株式会社 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5418510 大阪府大阪市中央区道修町 2 丁目 2 番 8 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 山中 伸弥 (YAMANAKA, Shinya) [JP/JP]; 〒5430033 大阪府大阪市天王寺区堂ヶ芝 2-9-7-1401 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 五十部 穂 (ISOBE, Yutaka); 〒5540022 大阪府大阪市此花区春日出中 3 丁目 1 番 9 8 号 住友製薬株式会社 知的財産部内 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF SCREENING SOMATIC CELL NUCLEUS INITIALIZER

(54) 発明の名称: 体細胞核初期化物質のスクリーニング方法



(57) Abstract: It is intended to provide a method of screening a nucleus initializer for somatic cells which comprises: (a) the step of contacting a somatic cell having a gene which carries a marker gene at a site under the expression regulation by the expression regulatory domain of ECAT gene with test substances; and (b) the step of examining the occurrence or nonoccurrence of a cell expressing the marker gene after the completion of the above step (a) and then selecting a test substance causing the occurrence of the above cell as a candidate for a nucleus initializer for somatic cells, and so on.

(57) 要約: (a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と被験物質とを接触さ

[続葉有]

WO 2005/080598 A1



DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

せる工程、および (b) 前記 (a) の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、を含む、体細胞の核初期化物質のスクリーニング方法等を提供する。

## 明細書

## 体細胞核初期化物質のスクリーニング方法

技術分野

5       本発明は、体細胞核初期化物質の新規なスクリーニング方法に関する。より詳細には、本発明は、ECAT遺伝子を利用し、ES様細胞化をマーカー遺伝子の発現でモニターすることにより、体細胞からES様細胞への変換を誘導する物質（体細胞の核初期化（Nuclear reprogramming）を誘導する物質）を効率的に同定する方法に関する。また本発明は、ECAT遺伝子を利用し、ES様細胞化をマーカー遺伝子の発現でモニターすることにより、ES様細胞を効率的に選択する方法に関する。さらに本発明は、ECAT遺伝子を利用し、ES細胞の未分化・多能性維持（ES細胞としての状態維持）をマーカー遺伝子の発現でモニターすることにより、ES細胞の未分化・多能性維持物質を効率的に選択する方法に関する。

15       背景技術

      胚性幹細胞（ES細胞）は哺乳動物胚盤胞の内部細胞塊より樹立した幹細胞であり、すべての細胞へと分化する能力（分化多能性）を維持したまま、無限に増殖させることができる。この特性から、ES細胞から大量合成した心筋細胞や神経細胞を心筋梗塞やパーキンソン病患者に移植して治療する幹細胞療法が期待されている。しかしES細胞にはヒト受精卵を利用し、犠牲にするという致命的とも言える倫理的問題が存在する。一方、生体の各組織には神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞などの組織幹細胞が存在する。組織幹細胞は受精卵を使わないので倫理的問題が無く、また患者自身の細胞が使えるので拒絶反応も回避することができる。しかし組織幹細胞は単離が難しく、増殖能や分化能もES細胞に比べると比べものにならないほど限られている。組織幹細胞や分化細胞等の体細胞を何らかの手段により高い増殖能と分化多能性を有するES細胞に類似した細胞に変換することができたなら、このES様細胞は臨床応用にとって理想的な幹細胞となる。具体的には、例えば患者の体細胞を採取し、これを核初期化因子（核初期化を誘導する因子）で刺激してES様細胞に変換し、これを幹細胞として臨床応用することが期待される。しかしながら、

そのような核初期化因子の探索を効率良く行える系は存在していない。

ECAT遺伝子 (ES cell associated transcript gene)は、ES細胞等の分化全能性細胞で特異的に発現する遺伝子の総称である。これまでにECAT遺伝子として報告されているものとしては、転写因子Oct3 (Oct4、POU5f1とも呼ばれる。以下Oct3/4という) 遺伝子が知られている。また、同様な遺伝子がヒトでも報告されているが (5 hOct3/4遺伝子 ; Takeda et al., Nucleic Acids Research, 20:4613-4620(1992))、hOct3/4遺伝子についてはES細胞特異的な発現を証明したという報告はない。

近年我々のグループは、ESTデータベースを利用したコンピューター解析およびノザンブロット解析に基づき、ES細胞で特異的に発現する9個の遺伝子を見出し、10 これをECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、およびECAT9遺伝子と命名した (WO 02/097090 号公報)。このうちECAT4はNanogとも呼ばれる因子であり、ES細胞が有する全能性 (分化多能性) の維持に必須の因子であることが明らかとなった (Mitsui, K., et al., Cell, 113: 631-642(2003))。またECAT5はERasとも呼ばれる因子であり、ES細胞の増殖を促進する因子であることが明らかになっている (Takashi, K., et al., Nature, 423: 541-545(2003))。15

またECAT3はF-box含有タンパクの1種、Fbx15であり、F-boxを有することからユビキチンリガーゼであると考えられている。ECAT3遺伝子の発現調節領域を解析した結果、ES細胞特異的転写因子であるOct4とSox2の2つにより協調的に発現調節を受けていることが明らかとなった (Tokuzawa, Y., et al., Molecular and Cellular Biology, 23(8): 2699-2708(2003))。20

ECAT3の機能を調べるために、ECAT3遺伝子のコーディング領域に $\beta$  geo ( $\beta$  ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子) をノックインして作製したノックインマウスを解析した結果、当該マウスには明らかな異常が認められず、また25 ホモ変異ES細胞にも増殖や分化能において明らかな異常は認められなかった。このことからECAT3遺伝子は、ES細胞の維持や増殖にとって必須の因子ではないと考えられている (Tokuzawa, Y., et al., Molecular and Cellular Biology, 23(8): 2699-2708(2003))。

### 発明の開示

本発明の目的は、ECAT遺伝子を利用し、ES類似細胞を効率良く選択するシステムと、同システムを利用した体細胞（組織幹細胞、分化細胞）の核初期化物質のスクリーニング法を提供することにある。また本発明の別の目的は、ECAT遺伝子を利用した、ES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法を提供することにある。

前述のように、体細胞を何らかの手段により高い増殖能と分化多能性を有するES細胞に類似した細胞に変換することができたなら、このES様細胞は臨床応用にとって理想的な幹細胞となる。本発明者はこのようなES様細胞への変換を誘導する物質（体細胞の核初期化物質）を効率的にスクリーニングすることの可能な方法につき鋭意検討した。

本発明者はまず、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた体細胞を作製した。具体的には、ECAT3遺伝子にマーカー遺伝子である  $\beta$  geo 遺伝子をノックインしたノックインマウスから体細胞（リンパ球）を調製した。この体細胞をES細胞の培養条件で培養し、G418で選択したところ、全て死滅し、薬剤耐性コロニーは一つも得られなかった。一方、前記体細胞を正常ES細胞と融合し、ES細胞の培養条件で培養し、G418で選択したところ、生存細胞が出現した。この生存細胞を解析した結果、ECAT4やOct3/4を発現し、ES細胞としての性質を有するES様細胞であることが分かった。以上の実験結果より、体細胞とES細胞との融合により体細胞の核が初期化（リプログラミング）されたためにES様細胞が出現し、そしてECAT3遺伝子に置き換えられた  $\beta$  geo が発現して薬剤耐性となったことが明らかとなった。

以上のようにECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞は、ES様細胞に変換された時にのみ、マーカー遺伝子を発現する。すなわちES様細胞への変換を薬剤耐性等のマーカー遺伝子の発現で容易にモニターすることができる。この性質を利用すれば、体細胞からES様細胞への変換を誘導する核初期化因子を、薬剤耐性等のマーカー遺伝子の発現を指標として効率的にスクリーニングすることができる。また同様に、前記マーカー遺伝子の発現を指標として、ES様細胞を効率的に選択することができる。

本発明者らはさらに、ECAT3のみならず、ECAT2やECAT5等の他のECATに関しても、前記スクリーニングやES様細胞の選択に利用できることを見出した。ECAT遺伝子（ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子）はいずれもES細胞で特異的に発現する遺伝子であることが知られているため、いずれのECATについても前記のスクリーニングに用いることができる。特に、ECAT遺伝子をノックイン等の手法により破壊する場合には、ES細胞の維持や増殖において必須ではないECAT2およびECAT3が非常に有効に利用される。

さらに「ES様細胞への変換を薬剤耐性等のマーカー遺伝子の発現で容易にモニターする」という前記システムは、ES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニングにも応用することができる。マウスES細胞はサイトカインLIFにより未分化・多能性が維持できる。さらに細胞数が多いときはLIFを添加した無血清培地によりフィーダー細胞を用いずに維持することができる。しかし低密度では血清もしくはフィーダー細胞が必須である。これは血清やフィーダー細胞の分泌産物にLIF以外のES細胞維持因子が含まれることを示す。またヒトES細胞もマウスフィーダー細胞上で一部の細胞は未分化・多能性が維持されるが、全ての細胞を未分化状態で維持することはできない。さらにマウスES細胞と異なりヒトES細胞ではLIFは無効である。これはやはり、フィーダー細胞がLIF以外のES細胞未分化・多能性維持因子を分泌することを示唆すると同時に、フィーダー細胞分泌産物とも異なる更なる因子の必要性を示唆している。ヒトES細胞を臨床応用する場合、動物血清やフィーダー細胞を用いずに培養することが必須であり、ES細胞の未分化・多能性維持因子の同定が求められている状況にあるが、効率的な同定法は未だ見出されていない。

本発明の前記システムによれば、ES細胞状態を薬剤耐性等のマーカー遺伝子の発現で容易にモニターすることができるため、例えばES細胞状態を維持できない培養条件下に被験物質を添加し、マーカー遺伝子発現細胞の存在の有無を調べることで、ES細胞の未分化・多能性維持（候補）物質を容易にスクリーニングすることができる。

本発明はこのような知見に基づき完成するに至ったものである。

すなわち本発明は、下記に掲げるものである：

(1) 以下の (a) および (b) の工程を含む、体細胞の核初期化物質のスクリーニング方法：

(a) E C A T 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

5 (b) 前記 (a) の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

(2) E C A T 遺伝子が、E C A T 1 遺伝子、E C A T 2 遺伝子、E C A T 3 遺伝子、E C A T 4 遺伝子、E C A T 5 遺伝子、E C A T 6 遺伝子、E C A T 7 遺伝子、E C A T 8 遺伝子、E C A T 9 遺伝子および O c t 3 / 4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、前記 (1) 記載のスクリーニング方法、

10

(3) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記 (1) または (2) 記載のスクリーニング方法、

(4) 体細胞が、E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞である、前記 (1) ~ (3) いずれか記載のスクリーニング方法、

15

(5) 体細胞が、E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞である、前記 (4) 記載のスクリーニング方法、

(6) E C A T 遺伝子が E C A T 1 遺伝子、E C A T 2 遺伝子、E C A T 3 遺伝子、E C A T 4 遺伝子、E C A T 5 遺伝子、E C A T 6 遺伝子、E C A T 7 遺伝子、E C A T 8 遺伝子、E C A T 9 遺伝子および O c t 3 / 4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、前記 (4) または (5) 記載のスクリーニング方法、

20

(7) 以下の (a) および (b) の工程を含む、前記 (1) 記載のスクリーニング方法：

(a) E C A T 2 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

25

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

(8) 以下の (a) および (b) の工程を含む、前記 (1) 記載のスクリーニン

グ方法：

(a) E C A T 3 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

5 (b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

(9) 以下の (a) および (b) の工程を含む、前記 (1) 記載のスクリーニング方法：

(a) E C A T 5 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

10 (b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

(10) 以下の (a) および (b) の工程を含む、前記 (1) 記載のスクリーニング方法：

15 (a) E C A T 2 遺伝子および E C A T 3 遺伝子に、それぞれ薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

20 (11) E C A T 2 遺伝子と E C A T 3 遺伝子が、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子でノックインされている、前記 (10) 記載のスクリーニング方法、

(12) 体細胞が、E C A T 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞である、前記 (7) ~ (11) いずれか記載のスクリーニング方法、

25 (13) 以下の (a) および (b) の工程を含む、前記 (1) 記載のスクリーニング方法：

(a) E C A T 4 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、



(14) 体細胞が、ECAT 4 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をベテロで含有する体細胞である、前記 (13) 記載のスクリーニング方法、

5 (15) 以下の (a) および (b) の工程を含む、前記 (13) 記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT 4 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞に ECAT 4 を供給し、被験物質を接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

10 (16) 体細胞が、ECAT 4 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞である、前記 (15) 記載のスクリーニング方法、

(17) 前記 (1) ~ (16) いずれか記載のスクリーニング方法を用いて選択される核初期化物質、

15 (18) ES 細胞由来の遺伝子またはタンパク質である、前記 (17) 記載の核初期化物質、

(19) ES 細胞が NAT 1 遺伝子破壊 ES 細胞である、前記 (18) 記載の核初期化物質、

(20) NAT 1 遺伝子破壊 ES 細胞に由来する物質、

20 (21) cDNA ライブラリー、タンパク質ライブラリー、または細胞抽出物である、前記 (20) 記載の物質、

(22) ECAT 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するノックインマウスの、前記 (1) ~ (16) いずれか記載のスクリーニング方法において用いる体細胞の供給源としての使用、

25 (23) ノックインマウスが、ECAT 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するノックインマウスである、前記 (22) 記載の使用、

(24) ECAT 遺伝子が ECAT 1 遺伝子、ECAT 2 遺伝子、ECAT 3 遺伝子、ECAT 4 遺伝子、ECAT 5 遺伝子、ECAT 6 遺伝子、ECAT 7 遺伝子、ECAT 8 遺伝子、ECAT 9 遺伝子および Oct 3/4 遺伝子から選択され

る1または2以上の遺伝子である、前記(22)または(23)記載の使用、

(25) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(22)～(24)いずれか記載の使用、

5 (26) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞、

(27) ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(26)記載の体細胞、

10

(28) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(26)または(27)記載の体細胞、

(29) ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する、前記(26)～(28)いずれか記載の体細胞、

15

(30) ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する、前記(29)記載の体細胞、

(31) ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する分化ES細胞である、前記(30)記載の体細胞、

20

(32) ECAT4が細胞内に供給された、前記(31)記載の体細胞、

(33) 以下の(a)および(b)の工程を含む、ES様細胞の選択方法：

(a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

25

(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞をES様細胞として選択する工程、

(34) ECAT遺伝子が、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択さ

れる1または2以上の遺伝子である、前記(33)記載の選択方法、

(35) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(33)または(34)記載の選択方法、

5 (36) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(33)記載の選択方法：  
:

(a) ECAT2遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

10 (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、

(37) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(33)記載の選択方法：  
:

15 (a) ECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、

20 (38) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(33)記載の選択方法：  
:

(a) ECAT5遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

25 (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、

(39) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(33)記載の選択方法：  
:

(a) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核

## 10

初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞を E S 様細胞として選択する工程、

5 (40) E C A T 2 遺伝子および E C A T 3 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子が存在する、前記 (39) 記載の選択方法、

(41) 以下の (a) および (b) の工程を含む、前記 (33) 記載の選択方法：

10 (a) E C A T 4 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞を E S 様細胞として選択する工程、

15 (42) 体細胞が、E C A T 遺伝子発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を挿入したベクターを含有する体細胞である、前記 (33) ～ (41) いずれか記載の選択方法、

(43) E C A T 遺伝子が E C A T 1 遺伝子、E C A T 2 遺伝子、E C A T 3 遺伝子、E C A T 4 遺伝子、E C A T 5 遺伝子、E C A T 6 遺伝子、E C A T 7 遺伝子、E C A T 8 遺伝子、E C A T 9 遺伝子および O c t 3 / 4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、前記 (42) 記載の選択方法、

20 (44) 前記 (26) ～ (32) いずれか記載の体細胞の、前記 (1) ～ (16) いずれか記載のスクリーニング方法または前記 (33) ～ (43) いずれか記載の選択方法における使用、

25 (45) 前記 (1) ～ (16) いずれか記載のスクリーニング方法において出現したマーカー遺伝子発現細胞または生存細胞、若しくは前記 (33) ～ (43) いずれか記載の選択方法において選択された E S 様細胞、

(46) 以下の (a) および (b) の工程を含む、E S 細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法：

(a) E C A T 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝

## 1 1

子を存在させた遺伝子を含むES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の存在の有無を調べ、該細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(47) ECAT遺伝子が、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(46)記載のスクリーニング方法、

(48) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(46)または(47)記載のスクリーニング方法、

(49) ES細胞が、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含むES細胞である、前記(46)～(48)いずれか記載のスクリーニング方法、

(50) ES細胞が、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含むES細胞である、前記(49)記載のスクリーニング方法、

(51) ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(49)または(50)記載のスクリーニング方法、

(52) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(46)記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT2遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含むES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工

## 1 2

程、

(53) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(46)記載のスクリーニング方法：

5 (a) ECAT3遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含むE S細胞を、E S細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をE S細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

10 (54) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(46)記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT5遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含むE S細胞を、E S細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

15 (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をE S細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(55) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(46)記載のスクリーニング方法：

20 (a) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子に、それぞれ薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含むE S細胞を、E S細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をE S細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

25 (56) ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子が、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子でノックインされている、前記(55)記載のスクリーニング方法、

(57) E S細胞が、ECAT遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するE S細胞である、前記(52)～(56)いずれか

## 1 3

記載のスクリーニング方法、

(58) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(46)記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT 4 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含むE S細胞を、E S細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をE S細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(59) E S細胞が、ECAT 4 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有するE S細胞である、前記(58)記載のスクリーニング方法、

(60) 前記(46)～(59)いずれか記載のスクリーニング方法を用いて選択されるE S細胞の未分化・多能性維持物質、

(61) フィーダー細胞の分泌産物である、前記(60)記載のE S細胞の未分化・多能性維持物質、

(62) 血清由来成分である、前記(60)記載のE S細胞の未分化・多能性維持物質、

(63) ECAT 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含むノックインマウスの、前記(46)～(59)いずれか記載のスクリーニング方法において用いるE S細胞の供給源としての使用、

(64) ノックインマウスが、ECAT 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するノックインマウスである、前記(63)記載の使用、

(65) ECAT 遺伝子がECAT 1 遺伝子、ECAT 2 遺伝子、ECAT 3 遺伝子、ECAT 4 遺伝子、ECAT 5 遺伝子、ECAT 6 遺伝子、ECAT 7 遺伝子、ECAT 8 遺伝子、ECAT 9 遺伝子およびOct 3/4 遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(63)または(64)記載の使用、

(66) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(6

3) ~ (65) いずれか記載の使用、

(67) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有するES細胞、

(68) ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺  
5 伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺  
伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択され  
る1または2以上の遺伝子である、前記(67)記載のES細胞、

(69) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素  
遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(6  
10 7)または(68)記載のES細胞、

(70) ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する、  
前記(67) ~ (69) いずれか記載のES細胞、

(71) ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有  
する、前記(70)記載のES細胞、ならびに

15 (72) 前記(67) ~ (71) いずれか記載のES細胞の、前記(46) ~ (59) いずれか記載のスクリーニング方法における使用。

#### 図面の簡単な説明

図1は、実施例1の概要を示した図である。ECAT3 <sup>$\beta$  g<sup>oo</sup>/  $\beta$  g<sup>oo</sup></sup>マウスより単離し  
20 たリンパ球と正常ES細胞とを融合し、G418で選択した結果、Oct3/4およびNanog(ECAT4)陽性のES様細胞が出現したことを示している。

図2は、ECAT3 <sup>$\beta$  g<sup>oo</sup>/  $\beta$  g<sup>oo</sup></sup>マウスより単離したリンパ球と正常ES細胞とを融合し、G418で選択した細胞をフローサイトメトリー(FACS)で解析した結果を示す図である。融合前(図中WT)と比べ、融合細胞(図中Fusion)では、大きさ(FSC)は約  
25 2倍となり、DNA量(PI)も4倍体となったことを示している。

図3は、ECAT2遺伝子の各種細胞・組織における発現をRT-PCRで解析した結果を示す図である。(A)はRT-PCRによる増幅サイクルを25回繰り返し結果を示し、また(B)は30回繰り返し結果を示す。ESG1はECAT2の結果を、NAT1はポジティブコントロールであるNAT1の結果を指す。各レーンは以下の細胞・組織におけるECAT



2またはNAT1の発現を示す：レーン1：未分化MG1.19細胞、レーン2：分化MG1.19細胞、レーン3：RT-MG1.19細胞、レーン4：未分化RF-8細胞、レーン5：分化RF-8細胞、レーン6：RT-RF-8細胞、レーン7：脳、レーン8：心臓、レーン9：腎臓、レーン10：精巣、レーン11：脾臓、レーン12：筋肉、レーン13：肺、レーン14：胃、レーン15：卵巣、レーン16：胸腺、レーン17：肝臓、レーン18：皮膚、レーン19：小腸。

図4は、ECAT2遺伝子を $\beta$  geo ( $\beta$ ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子) またはHygro (ハイグロマイシン耐性遺伝子) でノックインするためのターゲティングベクターと、それを用いたECAT2遺伝子破壊の概念を示した図である。

図5は、ターゲティングベクターをES細胞に導入して得られた薬剤耐性細胞において、相同組み換えが正しく起こっていることを確認したサザンブロット解析の図である。図中、WTはベクター導入のないES細胞の結果を示す。また図中、-/- (レーンNo. 27、35、36) は $\beta$  geoベクターとHygroベクターの両方で相同組換えを起こしたECAT2遺伝子ホモ変異ES細胞の結果を、 $\beta$ -geo +/- (レーンNo. 78、30、32、33) は $\beta$  geoベクターで相同組換えを起こしたECAT2遺伝子ヘテロ変異ES細胞の結果を、またhygro +/- (レーン4、7、31、34) はHygroベクターで相同組換えを起こしたECAT2遺伝子ヘテロ変異ES細胞の結果を、それぞれ示す。

図6は、 $\beta$  geoベクターとHygroベクターの両方で相同組換えを起こしたECAT2遺伝子ホモ変異ES細胞において、ECAT2遺伝子の発現が消失していることを確認したノザンブロット解析の図である。図中、各レーンの説明は図5と同じである。上図はノザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラムであり、下図はリボゾーマルRNAをエチジウムブロマイド染色した写真を示す。

図7は、正常ES細胞(RF8)と胸腺細胞との融合効率をフローサイトメーターで解析した結果を示す図である。全身で緑色蛍光蛋白(EGFP)を発現するマウス(CAG-EGFPマウス)に由来する胸腺細胞と正常ES細胞をDC300Vおよび500Vの2条件で融合させ(図中RF8/ $T^{CAG-EGFP}$ )、翌日、融合によりEGFP陽性となった細胞の割合をフローサイトメーターにより測定した。

図8は、NAT1遺伝子ノックアウトES細胞と胸腺細胞との融合効率をフローサイト

メーターで解析した結果を示す図である。NAT1遺伝子ノックアウトES細胞 (NAT1<sup>-/-</sup> (neo/Cre) ; ネオマイシン耐性遺伝子は除去済み) を用いて、図7と同様の実験を行った。

図9は、正常ES細胞とNAT1遺伝子ノックアウトES細胞の核初期化活性を調べた結果を示すグラフである。正常ES細胞またはNAT1遺伝子ノックアウトES細胞と、ECAT3ノックインマウス (Fbx15<sup>-/-</sup>) 由来の胸腺細胞との融合実験を、様々なパルス電圧を用いて行った。G418で選択後に出現したES細胞様コロニー数を測定した。上図 (RF8/T<sup>Fbx15</sup><sup>-/-</sup>) ; RF8とECAT3ノックインマウス (Fbx15<sup>-/-</sup>) 由来胸腺細胞との融合実験結果、下図 (NAT1<sup>-/-</sup> (neo/Cre) /T<sup>Fbx15</sup><sup>-/-</sup>) ; NAT1遺伝子ノックアウトES細胞とECAT3ノックインマウス (Fbx15<sup>-/-</sup>) 由来胸腺細胞との融合実験結果。図中、横軸はパルスした電圧 (V) を示し、縦軸はG418で選択後に出現したES細胞様コロニー数を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本明細書において、アミノ酸、(ポリ)ペプチド、(ポリ)ヌクレオチドなどの略号による表示は、IUPAC-IUBの規定 [IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)]、 「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」 (日本国特許庁編)、および当該分野における慣用記号に従う。

本明細書において「ECAT遺伝子 (ES cell associated transcript gene)」とは、ES細胞等の分化全能性細胞で特異的に発現する遺伝子の総称である。具体的には、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子、Oct3/4遺伝子が挙げられる (WO 02/097090 号公報)。本明細書において「ECAT遺伝子」という用語を用いる場合、技術内容に応じて、ECATのcDNA (mRNA) のみならず、ECATのゲノムDNAを指す場合もある。

これらECAT cDNAのマウス型・ヒト型の塩基配列およびアミノ酸配列についてはWO 02/097090 号公報に記載されている。本明細書の配列表においては、以下の配列番号に示される。

表 1

ECAT遺伝子	マウス型塩基配列	マウス型アミノ酸配列	ヒト型塩基配列	ヒト型アミノ酸配列
ECAT1	配列番号:1	配列番号:2	配列番号:3	配列番号:4
ECAT2	配列番号:5	配列番号:6	配列番号:7	配列番号:8
ECAT3	配列番号:9	配列番号:10	配列番号:11	配列番号:12
ECAT4	配列番号:13	配列番号:14	配列番号:15	配列番号:16
ECAT5	配列番号:17	配列番号:18	配列番号:19	配列番号:20
ECAT6	配列番号:21	配列番号:22		
ECAT7	配列番号:23	配列番号:24	配列番号:25	配列番号:26
ECAT8	配列番号:27	配列番号:28	配列番号:29	配列番号:30
ECAT9	配列番号:31	配列番号:32	配列番号:33	配列番号:34
Oct3/4	配列番号:35	配列番号:36	配列番号:37	配列番号:38

「ECAT遺伝子」（ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子）の範疇には、前記配列番号に示した塩基配列を含有する遺伝子のみならず、ES細胞に特異的に発現するという特徴を有する限り、これらの塩基配列に類似の塩基配列を含有する遺伝子も含まれる。

ここで「類似の塩基配列を含有する遺伝子」とは、前記配列番号に示される塩基配列中、1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含有する遺伝子や、前記配列番号で示される塩基配列と高い相同性を有する塩基配列を含有する遺伝子が挙げられる。

ここで「高い相同性を有する塩基配列を含有する遺伝子」とは、各ECAT遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子を意味し、具体的には前記配列番号で示された塩基配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の相同性を有する塩基配列を含有する遺伝子が挙げられる。ここでストリンジェントな条件とは、ハイブリダイズ反応や洗浄の際の温度、塩濃度等を適宜変化させることにより調節することができ、所望の相同性に応じて設定されるが、例えば塩濃度：6×SSC、温度：65℃の条件が挙げられる。

また「ECAT」（ECAT1、ECAT2、ECAT3、ECAT4、ECAT5、ECAT6、ECAT7、ECAT8、EC

AT9およびOct3/4)の範疇には、前記配列番号に示したアミノ酸配列を含有するタンパク質のみならず、ES細胞に特異的に発現するという特徴を有する限り、これらのアミノ酸配列に類似のアミノ酸配列を含有するタンパク質も含まれる。

ここで「類似のアミノ酸配列を含有するタンパク質」とは、前記類似の塩基配列を含有する遺伝子によりコードされるタンパク質を指す。

本発明のスクリーニング方法は、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた体細胞をスクリーニング用細胞として使用し、当該細胞に被験物質を接触させ、体細胞がES様細胞に変換されたことをマーカー遺伝子発現細胞の出現の有無でモニターすることにより、体細胞の核初期化物質(ES様細胞への変換物質)を効率的に同定する方法である。以下、本方法について具体的に説明する。

#### (1) 本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニング方法

本発明は、以下の(a)および(b)の工程：

- (a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
  - (b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
- を含む、体細胞の核初期化物質のスクリーニング方法を提供する。

前記で「ECAT遺伝子」とは、具体的には、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子が挙げられる。ここで「1または2以上」とは、具体的には1または2～3個のECAT遺伝子の組み合わせが挙げられ、好ましくは1個のECAT遺伝子、または2個のECAT遺伝子の組み合わせが挙げられる。具体的にはECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、またはこれらECAT2遺伝子とECAT3遺伝子の組み合わせが例示される。

前記ECAT遺伝子は、マウス、ラット、ヒト、サル等如何なる種由来のECAT遺伝子であっても良いが、好ましくはマウス、ヒト由来のECAT遺伝子が挙げられる。

前記で「マーカー遺伝子」とは、当該マーカー遺伝子を細胞に導入することにより、細胞の選別や選択を可能とするような遺伝子全般を指す。具体的には薬剤耐性

遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子が挙げられる。

薬剤耐性遺伝子としては、具体的にはネオマイシン耐性遺伝子 (neo)、テトラサイクリン耐性遺伝子 (tet)、カナマイシン耐性遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子 (zeo)、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (hygro) 等が挙げられる。各薬剤を含有する培地 (選択培地という) で細胞を培養することにより、薬剤耐性遺伝子が導入・発現した細胞のみが生き残る。従って、選択培地で細胞を培養することにより、薬剤耐性遺伝子を含有する細胞を容易に選択することができる。

蛍光タンパク質遺伝子としては、具体的にはGFP (緑色蛍光タンパク質) 遺伝子、YFP (黄色蛍光タンパク質) 遺伝子、RFP (赤色蛍光タンパク質) 遺伝子、エクオリン遺伝子等が挙げられる。これら蛍光タンパク質遺伝子が発現した細胞は、蛍光顕微鏡で検出することができる。また蛍光強度の違いを利用することによりセルソーター等で分離・選択することや、細胞を限界希釈して1ウェルあたり1細胞以下とした後に培養・増殖させ、蛍光を発する細胞 (ウェル) を蛍光顕微鏡下で検出することにより当該細胞を選択することができる。さらに、軟寒天培地などの上でコロニーを形成させ、蛍光顕微鏡下などでコロニーを選択することもできる。

発光酵素遺伝子としては、具体的にはルシフェラーゼ遺伝子等が挙げられる。これら発光酵素遺伝子を発現した細胞は、発光基質を加えて発光光度計で発光量を測定することにより検出することができる。また細胞を限界希釈して1ウェルあたり1細胞以下とした後に培養・増殖させ、各ウェルから一部の細胞を採取し、発光基質を加えて発光光度計で発光の如何を測定することにより当該細胞を選択することができる。

発色酵素遺伝子としては、具体的には $\beta$ ガラクトシダーゼ遺伝子、 $\beta$ グルクロニダーゼ遺伝子、アルカリフォスファターゼ遺伝子、又は分泌型アルカリフォスファターゼであるSEAP遺伝子等が挙げられる。これら発色酵素遺伝子が発現した細胞は、発色基質を加えて発色の有無を観察することにより検出することができる。また細胞を限界希釈して1ウェルあたり1細胞以下とした後に培養・増殖させ、各ウェルから一部の細胞を採取し、発色基質を加えて発色の如何を観察することにより当該細胞を選択することができる。

## 20

これらマーカー遺伝子の組み合わせに係る遺伝子としては、具体的にはネオマイシン耐性遺伝子 (neo) と  $\beta$  ガラクトシダーゼ遺伝子 ( $\beta$ -gal) との融合遺伝子である  $\beta$  geo 遺伝子が挙げられる。

5 以上のようなマーカー遺伝子はいずれも当業者に周知であり、このようなマーカー遺伝子を含むベクターはインビトロジェン社、アマシャムバイオサイエンス社、プロメガ社、MBL (医学生物学研究所) 等から市販されている。

前記マーカー遺伝子のうち、細胞の選択が容易であるという観点から、特に好ましいのは薬剤耐性遺伝子、または当該薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子である。

10 前記において「体細胞」とは、正常ES細胞等の未分化・多能性維持細胞を除く全ての細胞を意味する。具体的には、例えば(1) 神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、精子幹細胞等の組織幹細胞 (体性幹細胞)、(2) 組織前駆細胞、(3) リンパ球、上皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞等の分化した細胞、(4) ES細胞から何らかの手法で未分化・多能性を消失させた細胞、(5) 体細胞とES細胞との融合細胞であって未分化・多能性を有さない細胞、などが挙げられる。

15 体細胞から核初期化物質により変換されて生じた「ES様細胞」とは、ES細胞としての性質を有する細胞、すなわち未分化・多能性を有する細胞を意味する。

本発明のスクリーニング方法においては、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含む体細胞を、スクリーニング用細胞として用いる。

20 ここで「発現調節領域」とは、遺伝子の発現 (転写) を調節する領域のことであり、「プロモーター領域」、若しくは「プロモーター及びエンハンサー領域」を含む領域を意味する。

ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させる方法は、いろいろ知られており、当業者に周知の如何なる方法を用いてマーカー遺伝子を存在させても良い。大別すると、(1-1) 個体 (マウス) を利用してマーカー遺伝子を存在させる場合と、(1-2) 個体を利用せずに細胞レベルでマーカー遺伝子を存在させる場合がある。以下に詳述する。

(1-1) 個体 (マウス) を利用してマーカー遺伝子を存在させる方法

個体 (マウス) を利用してマーカー遺伝子を存在させる場合は、ECAT遺伝子の発

## 2 1

現調節領域により発現調節を受けるゲノム上の位置にマーカー遺伝子を存在させる。この場合、個体が有するECAT遺伝子自身は、発現可能な形で存在していても良く、またECAT遺伝子が破壊された形で存在していても良い。

5 遺伝子の発現調節領域は、通常エクソン1より上流域に存在する。従って、ECAT遺伝子の発現調節領域によりマーカー遺伝子が発現調節を受けるためには、当該マーカー遺伝子は、ECAT遺伝子のエクソン1開始部位より下流域に存在させることが望ましい。この場合、エクソン1開始部位より下流であれば、どのような位置に存在していても良い。

(1-1-a) ECAT遺伝子を破壊する場合

10 ECAT遺伝子を破壊する方法は、当業者に周知の如何なる方法を用いても良いが、最も良く使われる手法としては、マーカー遺伝子を含有し、かつECAT遺伝子の任意の位置で相同組換えを起こすベクター（以下ターゲッティングベクターと称する）を用いて、相同組換えにより当該ECAT遺伝子を標的破壊し、代わりにマーカー遺伝子をこの位置に存在させる方法が挙げられる。このようにECAT遺伝子を破壊し、その位置にマーカー遺伝子を存在させることを、「ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインする」と言う。

15 このようなマーカー遺伝子をノックインする方法は種々知られているが、中でもプロモータートラップ法が好適に用いられる。当該プロモータートラップ法は、プロモーターを持たないターゲッティングベクターを相同組換えによりゲノム中に挿入し、相同組換えが正しく起こった場合に内在性プロモーター（ECAT遺伝子プロモーター）によりマーカー遺伝子が発現するというものである。以下、当該プロモータートラップ法によりECAT遺伝子発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させる方法につき具体例を示す。

25 まず、ターゲッティングに必要な ECAT遺伝子のゲノム配列を決定する。当該ゲノム配列は、例えば公的データベースであるMouse Genome Resources (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/mouse/>) 等において既に公知である場合はこの配列情報を利用して配列決定することができる。また未知の場合は、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35または37に記載のECAT遺伝子の一部をプライマーとして用い、当業者に入手可能なゲノムライブ

ラリーをPCR法等でスクリーニングすることにより、所望のECAT遺伝子のゲノム領域を含有するゲノミッククローンを単離することや、ゲノム塩基配列を決定することができる。ここで用いるゲノムライブラリーとしては、例えばマウスBAC(bacterial artificial chromosome)ライブラリー (Invitrogen) やPAC(P1-derived artificial chromosome)ライブラリー (Invitrogen) 等が挙げられる。

次に、前記で同定したECAT遺伝子のゲノムDNA配列に基づき、マーカー遺伝子と置き換えるECAT遺伝子ゲノム領域を決定する(以下、ECATゲノム領域Aと称する)。このECATゲノム領域Aを挟む5'側領域(5'アーム)と3'側領域(3'アーム)を、ゲノムDNAを鋳型としてPCRを行うことなどにより増幅する。ここで鋳型となるゲノムDNAとしては、ECAT遺伝子を含有するマウスBACクローンのゲノムDNA等が挙げられる。PCRのプライマーは前記ECAT遺伝子ゲノムDNAの配列に基づき設計することができる。増幅した5'アームおよび3'アームを、プロモータートラップ用ターゲッティングベクターのマーカー遺伝子カセットを挟む両側に挿入する。ここで用いるプロモータートラップ用ターゲッティングベクターとしては、例えばIRES(internal ribosome entry site)- $\beta$ geo( $\beta$ ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子)カセット(Mountford P. et al., Proc. Natl. Sci. USA, 91:4303-4307(1994))を含有するpBSSK(-)-IRES- $\beta$ geoや、IRES-Hygro(ハイグロマイシン耐性遺伝子)カセットを含有する同様のベクターなどを挙げるることができる。ここでIRES-Hygroカセットは、前記IRES- $\beta$ geoカセットの $\beta$ geo部分をHygro(Invitrogen)に置き換えることなどにより作製することができる。

次に作製されたターゲッティングベクターを制限酵素で消化して直鎖化し、これをエレクトロポレーション等によりES細胞に導入する。

導入に用いるES細胞としては、たとえばRF8細胞(Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046(1996))、JI細胞(Li, E. et al., Cell, 69:915-926(1992))、CGR8細胞(Nichols, J. et al., Development, 110:1341-1348(1990))、MG1.19細胞(Gassmann, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92:1292-1296(1995))や、市販されているマウスES細胞129SV(No. R-CMTI-1-15, R-CMTI-1A)、マウスES細胞C57/BL6(No. R-CMTI-2A)、マウスES細胞DBA-1(No. R-CMTI-3A)(以上大日本製薬)等のES細胞が挙げられる。



## 23

ターゲッティングベクターのES細胞への導入は、エレクトロポレーション (Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046 (1996) 等参照)、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、遺伝子導入用リピッド (Lipofectamine、Lipofectin; Invitrogen) を用いる方法などにより行  
5 われる。その後当該ターゲッティングベクターが導入されたES細胞を、用いたマーカー遺伝子 (例えば薬剤耐性遺伝子) の特性に基づき選択する。選択されたES細胞において正しく相同組み換えが起こっていることはECAT遺伝子の一部をプローブとして用いたサザンブロット等により確認することができる。以上のようにしてECATゲノム遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有するES細胞  
10 を作製することができる。

ES細胞の培養には、当業者に知られた如何なる培地を用いても良い。例えばRF8細胞の場合、以下の組成: 15%FBS、0.1mM Non Essential Amino Acids (GIBCO BRL)、2mM L-glutamine、50U/mlペニシリン-ストレプトマイシン、0.11mM 2-ME (GIBCO BRL)/Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) の培地等が挙げられる。また市  
15 販の調製済み培地 (例えば大日本製薬No. R-ES-101等) を用いることもできる。

ES細胞の培養においてフィーダー細胞を用いる場合、当該フィーダー細胞は、マウス胚から常法により調製した繊維芽細胞や繊維芽細胞由来のSTO細胞株 (Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046 (1996)) を用いても良く、また市販品を用いても良い。市販品としては、例えば PMEF-N、PMEF-NL、PMEF-H、PMEF-HL (以上大日本製薬) などのフィーダー細胞が挙げられる。フィーダー細胞は  
20 、マイトマイシンC処理することにより増殖を停止させた後にES細胞の培養に用いることが望ましい。

また、ES細胞の培養において前記フィーダー細胞を用いない場合は、LIF (Leukemia Inhibitory Factor) を添加して培養を行うことができる。LIFとしてはマウス  
25 組み換えLIF、ラット組み換えLIF (ケミコン社等) などが用いられる。

次に、前記ターゲッティングベクターを含有するES細胞をマウスに導入してノックアウトマウス (マーカー遺伝子ノックインマウス) を作製する。当該マーカー遺伝子ノックインマウスの作製方法は当業者に周知である。具体的には、前記ES細胞をマウス (例えばC57BL/6等) の胚盤胞 (blastocyst) にインジェクトし、偽妊娠さ

## 24

せたメスのマウス（ICR等）の子宮内に移植することによりキメラマウスを作製する。その後キメラマウスと通常のマウス（C57BL/6等）とを交配させ、マーカー遺伝子がヘテロでノックインされたヘテロ変異マウスを作製する。ヘテロ変異マウス同士を交配させることにより、マーカー遺伝子がホモでノックインされたホモ変異マウスが得られる。

本発明のスクリーニングで用いる体細胞は、前記ヘテロ変異マウスから単離された体細胞であっても、またホモ変異マウスから単離された体細胞であっても良い。しかしながら、本発明のスクリーニングにおける体細胞からES様細胞への変換ステップ、およびES様細胞の維持を可能とするために、ES細胞の維持に必須のECAT遺伝子をノックアウトした場合は、ヘテロ変異マウス由来の体細胞を用いる必要がある。当該ES細胞の維持に必須のECAT遺伝子としては、具体的にはECAT4遺伝子（Mitsui, K., et al., Cell, 113: 631-642(2003)）が挙げられる。一方、ES細胞の維持に必須でないECAT遺伝子をノックアウトする場合は、ヘテロ変異マウス由来の体細胞を用いても、ホモ変異マウス由来の体細胞を用いても良い。当該ES細胞の維持に必須でないECAT遺伝子としては、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT5遺伝子が挙げられる。すなわちECAT3遺伝子に関しては文献（Tokuzawa, Y., et al., Molecular and Cellular Biology, 23(8): 2699-2708(2003)）に示されるように、ECAT5遺伝子に関しては文献（Takahashi, K., et al., Nature, 423: 541-545(2003)）に示されるように、またECAT2遺伝子については後述の実施例において初めて明らかにされたように、これらのECATはES細胞の維持に影響を与えない因子である。このうちECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子はES細胞の維持だけでなく増殖にも影響を与えないため、ホモ変異マウス由来の体細胞を用いる場合は、ECAT2遺伝子またはECAT3遺伝子にマーカー遺伝子をノックインしたホモ変異ノックインマウス由来の体細胞を利用することが好ましい。

ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有することにより、ヘテロで含有した場合と比較して、マーカー遺伝子が2倍発現していることになるので、マーカー発現細胞の選択が正確かつ容易になるという利点がある。この観点からECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子は非常に有用なターゲットである。

さらに、異なるECAT遺伝子のホモ変異マウス同士を交配させることにより、ダブ

ルノックインマウスを作製することができる。例えばECAT2遺伝子のホモ変異マウスと、ECAT3遺伝子のホモ変異マウスを交配させることにより、ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子の両方がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウスを作製することができる。その際、各ECAT遺伝子には、それぞれ異なるマーカー遺伝子が

5 ノックインされていることが好ましい。この場合、2つの異なるマーカー遺伝子（例えばネオマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子）により二重に選択することが可能となるため、本発明のスクリーニングにおいて擬陽性のES様細胞を選択する可能性が減少し、スクリーニングの成功確度が格段に向上できる。

具体的には、ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス、ECAT2遺伝子とECAT4遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス、ECAT2遺伝子とECAT5遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス、ECAT3遺伝子とECAT4遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス、ECAT3遺伝子とECAT5遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス、ECAT4遺伝子とECAT5遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス、に由来する体細胞が例示される。好ましくはECAT2遺伝子とECAT3遺伝子がホモでマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス由来の体細胞が挙げられる。

10

15

#### (1-1-b) ECAT遺伝子を破壊しない場合

ECAT遺伝子を破壊することなく、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させる手法としては、当該ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたBACベクターまたはPACベクター等を、マウスやラット等の個体に導入して作製したトランスジェニック非ヒト動物を利用する手法が挙げられる。以下BACベクターを例にとり説明する。

20

ここで用いるECAT遺伝子の発現調節領域を含有するBACクローンは、前記(1-1-a)に記述したように、ECAT遺伝子の配列情報に基づき単離・同定することができる。ECAT遺伝子含有BACクローンにおいて、ECAT遺伝子の一部をマーカー遺伝子に置き換えるには、例えば Red/ET Recombination(Gene Bridges)を用いて容易に行うことができる。各ECAT遺伝子の発現調節領域は、通常、ECAT遺伝子のエクソン1より

25

## 26

上流域に存在する。従って、ECAT遺伝子の発現調節領域によりマーカー遺伝子が発現調節を受けるためには、当該マーカー遺伝子は、ECAT遺伝子のエクソン1より下流域に存在させることが望ましい。この場合、エクソン1より下流であれば、ECAT遺伝子上のどのような位置にマーカー遺伝子を存在させても良い。

5       以上のようにして作製されたECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたBACベクター（以下、マーカー遺伝子含有BACベクターと称することがある）を導入したトランスジェニック動物を作製する方法は周知であり、例えば実験医学別冊「新遺伝子工学ハンドブック改訂第3版」（羊土社, 1999年）等に基づき作製することができる。以下、マウスを例にとりトランス  
10       ジェニック動物の作製につき説明する。

マウス受精卵への遺伝子の導入方法は特に限定されるものではなく、マイクロインジェクション法やエレクトロポレーション法等により導入することができる。導入後、得られた卵細胞を培養し、仮親マウスの輸卵管に移植し、その後被移植マウスを飼育し、産まれた仔マウスから所望の仔マウスを選択する。当該選択は、例え  
15       ば仔マウス由来のDNAをドットブロットハイブリダイゼーション法やPCR法で導入遺伝子の可否を調べることにより行うことができる。

前記仔マウスと野生型マウスとを交配させ、ヘテロトランスジェニックマウス（導入遺伝子をヘテロで含有するマウス）を作製する。ヘテロマウス同士を交配させることにより、マーカー遺伝子含有BACベクターをホモで含有するトランスジェニ  
20       ックマウスを得ることができる。

本発明のスクリーニングで用いる体細胞は、前記ヘテロトランスジェニックマウスから単離された体細胞であっても、またホモトランスジェニックマウスから単離された体細胞であっても良い。本トランスジェニックマウスにおいてはECAT遺伝子自身が発現しているため、前記ノックインマウスの場合と異なり、用いたECAT遺伝  
25       子がES細胞の維持に必須の遺伝子であるか否かを考慮する必要はない。よって、いずれのECAT遺伝子（ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子）についても等しく用いることができ、マーカー遺伝子発現量が多いという観点から、マーカー遺伝子をホモで含有するトランスジェニックマウスを利用するこ

とが好ましい。

さらに、異なるECAT遺伝子のトランスジェニックマウス同士を交配させることにより、ダブルトランスジェニックマウスを作製することができる。その際、交配させる各トランスジェニックマウスは、それぞれ異なるマーカー遺伝子を含有していることが好ましい。この場合、2つの異なるマーカー遺伝子（例えばネオマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子）により二重に選択することが可能となるため、本発明のスクリーニングにおいて擬陽性のES様細胞を選択する可能性が減少し、スクリーニングの成功確度が格段に向上できる。

以上のノックインマウスまたはトランスジェニックマウスから単離する体細胞は、マーカー遺伝子の発現していない（若しくは発現量の少ない）如何なる細胞であっても良い。具体的にはES細胞等の分化全能性細胞以外の細胞が挙げられ、例えば（1）神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、精子幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）、（2）組織前駆細胞、または（3）リンパ球、上皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞等の分化した細胞が挙げられる。当該細胞は当業者に周知の手法にて単離することができる。

一方、ES細胞を単離した場合は、何らかの手法でES細胞の未分化・多能性を消失させてから用いる（後述）。

以上のように、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした体細胞、またはマーカー遺伝子を導入した体細胞を、個体（マウス）レベルで維持することにより、あらゆる組織から、いつでも容易に体細胞を調製することが可能となるため、前記手法は非常に好ましい体細胞の供給方法である。

#### （1-2）個体を利用せずに細胞レベルでマーカー遺伝子を存在させる方法

個体を利用せずに、細胞内において、ECAT遺伝子発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させる方法はいろいろ知られており、当業者に周知の如何なる方法を用いてマーカー遺伝子を存在させても良い。一般的には、マーカー遺伝子を含有するベクターを細胞に導入する方法が挙げられる。

遺伝子導入に用いられる細胞は、体細胞であってもES細胞であっても良い。ここで用いる体細胞としては、マウス、ヒト、サル等の如何なる種に由来する体細胞であっても良い。当該体細胞は初代培養細胞であっても株化細胞であっても良く、具

体的には、胎児繊維芽細胞（MEF）、骨髓由来間葉系幹細胞、または精子幹細胞等の初代培養細胞や、NIH3T3のような株化細胞などが挙げられる。またES細胞としては、前記に挙げたマウスES細胞の他、ヒトやサルES細胞も用いることができる。ここでヒトES細胞としては、KhES-1、KhES-2あるいは KhES-3（以上、京大再生研  
5 付属幹細胞医学研究センター）などが挙げられ、またサルES細胞としてはカニクイザルES細胞（旭テクノグラス）を挙げることができる。これらES細胞を本発明のスクリーニングに用いる場合は、何らかの手法でES細胞の未分化・多能性を消失させてから用いる。

細胞へのベクターの導入方法としては、前記宿主細胞に適合した通常の導入方法  
10 を用いれば良い。具体的にはリン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、遺伝子導入用リピッド（Lipofectamine、Lipofectin; Invitrogen）を用いる方法などが挙げられる。

導入に用いるベクターとしては、約300kbのDNAまでクローニング可能なベクターであるBACベクターやPACベクター、プラスミドベクター、さらには前記(1-1)に記  
15 載したターゲッティングベクターなどが挙げられる。以下これら各ベクターを用いてECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた体細胞を作製する方法について記載する。

(1-2-a)BACベクター、PACベクターを用いる場合

ECAT遺伝子の発現調節領域を含有するBACベクターやPACベクターを利用すること  
20 により、ECAT遺伝子発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させることができる。以下BACベクターを例にとり説明する。

ここで用いるECAT遺伝子の発現調節領域を含有するBACクローン（以下ECAT遺伝子含有BACクローンと称する）は、前記(1-1)に記述したように、ECAT遺伝子の配列情報に基づき単離・同定することができる。ECAT遺伝子含有BACクローンにおいて  
25 、ECAT遺伝子の一部をマーカー遺伝子に置き換えるには、例えば Red/ET Recombination(Gene Bridges)を用いて容易に行うことができる。各ECAT遺伝子の発現調節領域は、通常、ECAT遺伝子のエクソン1より上流域に存在する。従って、ECAT遺伝子の発現調節領域によりマーカー遺伝子が発現調節を受けるためには、当該マーカー遺伝子は、ECAT遺伝子のエクソン1開始部位より下流域に存在させることが望ま

しい。この場合、エクソン1開始部位より下流であれば、ECAT遺伝子上のどのような位置にマーカー遺伝子を存在させても良い。

以上のようにして作製されたECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたBACベクターを体細胞に導入することにより、  
5 本発明のスクリーニング用の体細胞とすることができる。ここで導入するBACベクターは1種類であっても、異なるECAT遺伝子を含有する2種類以上のBACベクターであっても良い。なお、当該BACベクター導入細胞を選択培地中で容易に選択できるように、BACベクター中に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子（以下第2の薬剤耐性遺伝子と称する）が挿入されていることが好ましい。この場合、体細胞での発現を可能とするために、当該第2の薬剤耐性遺伝子の5'側または3'側に体細胞で発現するプロモーターが付加されている必要がある。また当該第2の薬剤耐性遺伝子は、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に存在するマーカー遺伝子と同じ種類の薬剤耐性遺伝子であっても良く、異なる種類の薬剤耐性遺伝子であっても良いが、異なる種類の薬剤耐性遺伝子であることが望ましい。前記で同じ種類の薬剤耐性遺伝子を用いた場合は、第2の薬剤耐性遺伝子の両側にloxP配列またはFRT配列を付加しておき、BACベクター導入細胞を選択培地中で選択した後に、リコンビナーゼCreまたはFLPにより第2の薬剤耐性遺伝子を切り出すことができる。  
10  
15

前記と異なり、BACベクター中に第2の薬剤耐性遺伝子を挿入しない場合は、当該第2の薬剤耐性遺伝子を含有する第2の発現ベクターを、前記BACベクターと共に共導入（co-transfection）し、選択培地で選択しても良い。その場合、第2の発現ベクターよりもBACベクターを大過剰に用いて導入を行うことが望ましい。  
20

前記ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたBACベクターをES細胞に導入した場合は、用いたマーカー遺伝子の性質に基づき、マーカー遺伝子が導入・発現しているES細胞を選択することができる。  
25 その後、当該ES細胞を体細胞に分化させることにより、本発明のスクリーニングに用いる体細胞とすることができる。ES細胞はフィーダー細胞の存在しない培養条件下で分化するため、このような条件下で分化させて得られた体細胞や、レチノイン酸等の当業者に知られた分化誘導剤で分化させて得られた体細胞を、本発明のスクリーニングに用いることができる。ここでES細胞から分化させた体細胞としては、

## 30

例えば組織幹細胞、組織前駆細胞、または体細胞（神経細胞、皮膚角質細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、血液細胞、膵島細胞または色素細胞など）が挙げられる。

(1-2-b) プロモーターを有さないプラスミドベクターを用いる場合

5 ECAT遺伝子の発現調節領域とマーカー遺伝子との融合遺伝子を、プロモーターを有さないプラスミドベクターに挿入し、細胞を形質転換することにより、本発明のスクリーニング用の細胞を作製することができる。

ここで用いるベクターとしては、例えば pBluescript(Stratagene)、pCR2.1(Invitrogen)といったプロモーターを有さないプラスミドベクターが挙げられる。

10 ここで用いるECAT遺伝子の発現調節領域は、例えば該遺伝子の転写開始部位上流約1 kb、好ましくは約2kbが挙げられる。

各ECAT遺伝子の発現調節領域は、例えば(i)5'-RACE法（例えば、5' full Race Core Kit(宝酒造社製)等を用いて実施される）、オリゴキャップ法、S1プライマーマッピング等の通常の方法により5'末端を決定するステップ；(ii)Genome Walker Kit(クローンテック社製)等を用いて5'-上流領域を取得し、得られた上流領域について、プロモーター活性を測定するステップ；を含む手法等により同定することができる。このようにして同定したECAT遺伝子発現調節領域の3'側にマーカー遺伝子を融合し、これを前記プラスミドベクターに挿入することにより、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたプラスミドベクターを作製することができる。

20 以上のようにして作製したベクターを、前記(1-2-a)と同様にして体細胞やES細胞に導入することにより、本発明のスクリーニング用体細胞を作製することができる。

(1-2-c) ターゲッティングベクターを用いる場合

25 前記(1-1)に記載したターゲッティングベクターを体細胞若しくはES細胞に導入することによっても、本発明のスクリーニング用体細胞を作製することができる。

前記ターゲッティングベクターを体細胞に導入する場合は、ベクター導入細胞を選択培地中で容易に選択できるように、前記(1-2-a)と同様に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子（第2の薬剤耐性遺伝子）をターゲッティングベクター上に存在させるか、またはターゲッティングベクターと共に第2の薬剤耐性遺伝子を含有する第2の発



現ベクターを共導入 (co-transfection) し、選択培地で選択して得られた体細胞を本発明のスクリーニングに用いることがより好ましい。その場合、第2の発現ベクターよりも前記ターゲッティングベクターを大過剰に用いて導入を行うことが望ましい。

- 5 前記体細胞は、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有していても良く、またホモで含有していても良い。ECAT4遺伝子を利用する場合は、前記ノックイン遺伝子をヘテロで含有することが望ましいが、ホモで含有する場合は、スクリーニングに際して細胞内にECAT4を供給すれば良い。またECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子およびECAT5遺伝子（特にECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子）を利用する場合は、前記ノックイン遺伝子をホモで含有することが望ましい。ECAT遺伝子に
- 10 マーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞は、ノックイン遺伝子をヘテロで含有する体細胞に、さらにノックイン遺伝子（マーカー遺伝子を含有するターゲッティングベクター）を導入することにより作製することができる。またノックイン遺伝子をヘテロで含有する体細胞を高濃度の薬剤を含む選択培地で
- 15 培養することによっても、選択することができる。

さらに、前記ノックイン遺伝子をホモで含有する体細胞に対して別のノックイン遺伝子（別のECAT遺伝子がノックアウトされた遺伝子）を導入することにより、前記(1-1)と同様のダブルノックイン細胞を作製することができる。

- 前記ターゲッティングベクターをES細胞に導入する場合は、ターゲッティングベクター上のマーカー遺伝子の性質に基づいて、マーカー遺伝子導入・発現細胞を選択することができる。当該ES細胞も、前記体細胞と同様、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有していても良く、またホモで含有していても良い。ホモ変異細胞の作製法としては、後述の実施例3に記載のECAT2遺伝子ホモ変異ES細胞の作製法を参照されたい。なお、ES細胞から体細胞への誘導方法は
- 20 、前記(1-2-a)と同様である。
- 25

文献 (Mitsui, K., et al., Cell, 113: 631-642(2003)) およびWO 2004/067744)に記載されたように、ECAT4遺伝子がホモ変異したES細胞 (ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたES細胞) は、もはや未分化・多能性を維持していないこと、すなわち分化していることが知られている。この細胞に対してECAT4遺

伝子を含むレトロウイルスベクターを感染させ、細胞内でECAT4を正常に発現させたが、ES細胞としての機能（未分化・多能性）は回復しなかった。

ECAT4はES細胞としての機能（未分化・多能性）維持に必須の因子であることから、ECAT4ホモ変異ES細胞に対してECAT4を供給した細胞は、ES細胞に近い状態の分化細胞であると言える。よってこの細胞に被験物質を接触させるスクリーニング系は、核初期化物質がより見出し易い、効率的なスクリーニング系であり、そのようなスクリーニングに用いるECAT4ホモ変異ES細胞、および当該細胞にECAT4を供給した細胞は本発明の好ましい体細胞である。

本発明のスクリーニング工程(a)においては、以上のようにして作製した体細胞と、被験物質とを接触させる。

ここで用いられる被験物質（被験試料）は制限されないが、核酸、ペプチド、タンパク質、有機化合物、無機化合物あるいはこれらの混合物などであり、本発明のスクリーニングは、具体的にはこれらの被験物質を前記体細胞と接触させることにより行われる。かかる被験物質としてより具体的には、細胞抽出液、遺伝子（ゲノム、cDNA）ライブラリー、RNAiライブラリー、アンチセンス核酸、遺伝子（ゲノム、cDNA、mRNA）、タンパク質、ペプチド、低分子化合物、高分子化合物、天然化合物などが挙げられる。より具体的には、実施例に示したES細胞、卵、ES細胞や卵の細胞抽出物（抽出画分）、ES細胞や卵由来のcDNAライブラリー、ゲノムライブラリーまたはタンパク質ライブラリー、あるいは増殖因子などが挙げられる。

cDNAライブラリー、タンパク質ライブラリーまたは細胞抽出物（有機化合物や無機化合物等）の由来としては、前述のようにES細胞や卵のような未分化細胞が好ましいが、特にNAT1遺伝子を破壊（ノックアウト）したES細胞が有効である。

NAT1遺伝子は蛋白質翻訳開始因子eIF4Gに類似した遺伝子であり、ES細胞においてNAT1遺伝子を破壊すると正常よりも未分化状態が増強されることが報告されている（Yamanaka, S. et al., Embo J., 19, 5533-5541(2000)）。しかしながら核初期化との関連性は示されていない。

後述の実施例に示すように、本発明者はNAT1遺伝子ノックアウトES細胞とECAT3ノックインマウス由来の胸腺細胞とを融合し、G418で選択を行ったところ、正常ES細胞を用いた時に比べて、ES細胞様コロニーの出現頻度が格段に高かった。このこ

## 3 3

とは、NAT1遺伝子ノックアウトES細胞は正常ES細胞より未分化度が高いだけではなく、初期化活性も高いことを示しており、本発明のスクリーニングに用いるcDNAライブラリー等の由来として極めて有効であると考えられる。

5       ここでcDNAライブラリーは、市販のcDNAライブラリー作製キット（例えばクローンマイナーcDNAライブラリー作製キット(Invitrogen) や Creator SMART cDNAライブラリー作製キット(BD Biosciences)等）を用いて作製することができる。またタンパク質ライブラリーはWO 00/71580 等を参考にして作製することができる。

10       なお前記NAT1遺伝子ノックアウトES細胞由来のcDNAライブラリー、タンパク質ライブラリーまたは細胞抽出物等は、本発明のスクリーニングのみならず、核初期化因子の如何なる機能的スクリーニングにおいても有効に用いることができる。

      これら被験物質は、体細胞への取り込み可能な形態で体細胞と接触させる。例えば被験試料が核酸（cDNAライブラリー等）の場合は、リン酸カルシウム、DEAE-デキストラン、遺伝子導入用リピッドまたは電気パルス等を用いて体細胞に導入する。

15       体細胞と被験物質とを接触させる条件は、該細胞が死滅せず且つ被験物質が取り込まれるのに適した培養条件（温度、pH、培地組成など）であれば特に制限はない。

      前記体細胞と被験物質との接触の前に、接触の際に、若しくは接触後に、ES細胞の培養条件で細胞培養を行う。ES細胞の培養は、当業者に知られた如何なる方法を用いても良い。例えばRF8細胞の場合、以下の組成：15%FBS、0.1mM Non Essential Amino Acids (GIBCO BRL)、2mM L-glutamine、50U/mlペニシリン-ストレプトマイシン、0.11mM 2-ME(GIBCO BRL)/Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)の培地等が挙げられる。また市販の調製済み培地（例えば大日本製薬No. R-ES-101等）を用いることもできる。

25       ES細胞の培養においてフィーダー細胞を用いる場合、当該フィーダー細胞は、マウス胚から常法により調製した繊維芽細胞や繊維芽細胞由来のSTO細胞株（Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046(1996)）を用いても良く、また市販品を用いても良い。市販品としては、例えば PMEF-N、PMEF-NL、PMEF-H、PMEF-HL（以上大日本製薬）などのフィーダー細胞が挙げられる。フィーダー細胞は

## 3 4

、マイトマイシンC処理することにより増殖を停止させた後にES細胞の培養に用いることが望ましい。

また、ES細胞の培養において前記フィーダー細胞を用いない場合は、LIF (Leukemia Inhibitory Factor) を添加して培養を行うことができる。LIFとしてはマウス  
5 組み換えLIF、ラット組み換えLIF (ケミコン社等) などが挙げられる。

前記ES細胞の培養条件における培養日数は、細胞の状態等により適宜変更できるが、1日～3日程度が好ましい。

マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子を用いた場合は、対応する薬剤を含む培地 (選択培地) で選択を行う。当該薬剤は、体細胞と被験物質との接触  
10 の際に培地に含まれていても良く、また接触後に含ませても良い。さらに、ES細胞の培養条件で培養した後に前記薬剤を培地に含ませても良い。

前記工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する (工程(b))。以下当該工程(b)について記述する。

マーカー遺伝子が薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子の場合は、前記のように選択培地で培養することによりマーカー遺伝子発現細胞を選択することができる。またマーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子の場合は蛍光顕微鏡で観察することによって、  
15 発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、また発色酵素遺伝子の場合は発色基質を加えることによって、マーカー遺伝子発現細胞を検出することができる。  
20

被験物質添加前に比してマーカー遺伝子発現細胞が検出された場合 (検出量が多くなった場合も含む)、ここで用いた被験試料 (被験物質) を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

前記スクリーニングは、必要に応じて何度でも繰り返し行うことができる。例えば1回目のスクリーニングでcDNAライブラリーや細胞抽出物といった混合物を用いた場合、2回目以降は、さらに当該混合物を細分化 (分画) して同様のスクリー  
25 ングを繰り返し行うことにより、最終的に、体細胞核初期化因子の候補物質を選択することができる。

なお、スクリーニングの効率を上げるための1つの例として、前記体細胞をその

ままスクリーニングに用いるのではなく、体細胞とES細胞とを融合させた融合細胞に対して、被験物質を添加するスクリーニング系が有効である。即ち本発明のスクリーニング方法には、

以下の(a)および(b)：

- 5 (a)ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞とES細胞とを融合させた融合細胞（体細胞）と、被験物質とを接触させる工程、
- (b)前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
- 10 を含む、体細胞の核初期化物質のスクリーニング方法も含まれる。
- ここで「融合細胞」とは、体細胞とES細胞との融合細胞であって前記マーカー遺伝子が発現していない（若しくは発現量が少ない）細胞を意味する。体細胞とES細胞とを融合させて生じるES様細胞のコロニー数に比して、さらに被験物質を添加した際にコロニー数が増加した場合、当該被験物質は体細胞核初期化候補物質として選
- 15 択することができる。

以下、前記本発明のスクリーニング方法の具体例として、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子およびECAT5遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法につき例示するが、いずれのECAT遺伝子（ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子）についても以下を参考にして同様のスクリーニングを実施

20 することができる。

#### 例1：ECAT2遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT2遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)及び(b)：

- 25 (a) ECAT2遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
- を含むスクリーニング方法が例示される。

後述の実施例に示したように、ECAT2遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子ではない。従って、ECAT2遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインした体細胞を用いて本発明のスクリーニングを行ことが好ましい。

ECAT2遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたノックインマウス (ECAT2 <sup>$\beta$ geo/ $\beta$ geo</sup>マウス) は、例えば後述の実施例3に記載の方法で作製することができる。このECAT2 <sup>$\beta$ geo/ $\beta$ geo</sup>マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件 (例えばMeiner, V. L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照) で細胞培養し、G418(0.25mg/ml) で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化 (候補) 因子を選択することができる。

#### 例2: ECAT3遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT3遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)及び(b):

- (a) ECAT3遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
  - (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
- を含むスクリーニング方法が例示される。

後述の実施例に示したように、ECAT3遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子ではない。従って、ECAT3遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインした体細胞を用いて本発明のスクリーニングを行ことが好ましい。

ECAT3遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたノックインマウス (ECAT3

$\beta$ geo/ $\beta$ geoマウス)は、例えば後述の実施例1に記載の方法で作製することができる。このECAT3 $\beta$ geo/ $\beta$ geoマウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件(例えばMeiner, V. L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照)で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml)で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクション法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化(候補)因子を選択することができる。

#### 例3: ECAT4遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT4遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)及び(b):

- (a) ECAT4遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
  - (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
- を含むスクリーニング方法が例示される。

ECAT4遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子である。従って、ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をヘテロでノックインした体細胞を用いて本発明のスクリーニングを行う。

ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をヘテロでノックインしたノックインマウス(ECAT4 $\beta$ geo/+マウス)の作製は、文献(Mitsui, K., et al., Cell, 113: 631-642(2003))に記載の方法等で作製することができるが、簡単に述べると以下の方法が例示される。

マウスECAT4遺伝子のエクソン2を、IRES- $\beta$ geoカセット(Mountford et al., Pro

c. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4303-4307(1994) ) で置き換えるためのターゲッティングベクターを以下のように作製する。ECAT4のイントロン1を含有する4kbフラグメントを、マウスゲノムDNAを鋳型とし、プライマー (AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG (配列番号: 39)、AGGCAGGTCTTCAGAGGAAGGGCG (配列番号: 40)) を用いてPCRで増幅することにより5'側アームを作製する。またエクソン3-イントロン3-エクソン4を含有する1.5kbフラグメントを、マウスゲノムDNAを鋳型とし、プライマー (CGGGCTGTAGACCTGTCTGCATTCTG (配列番号: 41)、GGTCCTTCTGTCTCATCCTCGAGAGT (配列番号: 42)) を用いてPCRで増幅することにより3'側アームを作製する。これら5'側アームと3'側アームをIRES- $\beta$ geoカセットにライゲートし、ターゲッティングベクターを作製する。このターゲッティングベクターをSacIIで切断し、エレクトロポレーションによりRF8 ES細胞に導入する (Meiner et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 93: 14041-14046(1996)参照)。その後G418選択培地にて、相同組み換えが正しく起こったクローンを選択する。この $\beta$ geoとの相同組み換えES細胞をマウスのブラストシストにインジェクションすることによりキメラマウスを経てヘテロ変異マウス (ECAT4 $\beta$ geo/+マウス) を樹立する。

次にこのECAT4 $\beta$ geo/+マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件 (例えばMeiner, V. L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照) で細胞培養し、G418で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクション法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化(候補)因子を選択することができる。

前記ECAT4遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の別の具体例として、以下(a)及び(b)：

(a) ECAT4遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有す



る体細胞にECAT4を供給し、被験物質を接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、を含むスクリーニング方法が例示される。

5 文献(Cell, 113: 631-642(2003)、WO 2004/067744)に記載のように、ECAT4はES細胞としての機能(未分化・多能性)維持に必須の因子であることから、ECAT4ホモ変異ES細胞に対してECAT4を供給した細胞は、ES細胞に近い状態の分化細胞であると言える。よってこの細胞に被験物質を接触させるスクリーニング系は、核初期化物質がより見出し易い、効率的なスクリーニング系である。

10 ここで用いられるECAT4ホモ変異ES細胞は、例えば前記 $\beta$  geoとの相同組み換えES細胞(ECAT4遺伝子が $\beta$  geo遺伝子でノックインされたヘテロ変異細胞)にhygroベクター(ECAT4遺伝子をHygroベクターで置き換えるためのターゲティングベクター)を導入することにより作製することができる。

15 このECAT4ホモ変異ES細胞(体細胞)に対してECAT4を供給する。当該供給は、ECAT4遺伝子含有発現ベクターを細胞に導入して発現させても良く、またECAT4タンパク質を細胞内に取り込まれる形態で(例えばTATのようなタンパクと融合させて)導入しても良い。

このECAT4(遺伝子)の導入と同時に、また導入後に被験物質を添加し、ES細胞の培養条件(例えばMeiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24):  
20 p14041-14046(1996)を参照)で細胞培養し、G418及び/又はハイグロマイシンで選択を行う。当該選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、まず前記体細胞(ECAT4ホモ変異ES細胞)に対してECAT4遺伝子を導入する。その後リポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418及び/又はハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化(候補)因子を選択することができる。

例4：ECAT5遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT5遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)及び(b)：

(a) ECAT5遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、を含むスクリーニング方法が例示される。

後述の実施例に示したように、ECAT5遺伝子はES細胞の維持に必須の因子ではない。従って、ECAT5遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインした体細胞を用いて本発明のスクリーニングを行ことが好ましい。

ECAT5遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたノックインマウス (ECAT5 <sup>$\beta$ geo/ $\beta$ geo</sup>マウス) は、例えば後述の実施例2に記載の方法 (特開2003-265166号公報) で作製することができる。このECAT5 <sup>$\beta$ geo/ $\beta$ geo</sup>マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件 (例えばMeiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p 14041-14046(1996)を参照) で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクション法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化(候補)因子を選択することができる。

例5：2つのECAT遺伝子を利用したスクリーニング

前述のように、2つの異なるECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインしたホモ変異マウス同士を交配させることによりダブルノックインマウスを作製することができ、当該マウス由来の体細胞をスクリーニングに用いることができる。具体的に

は、ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子の組み合わせに係るダブルノックインマウス由来の体細胞を用いたスクリーニング方法が例示される。すなわちECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)及び(b)：

- 5 (a) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子に、それぞれ薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含む体細胞と、被験物質とを接触させる工程、  
(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、  
を含むスクリーニング方法が例示される。

- 10 ここでノックインされる薬剤耐性遺伝子は、ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子とで異なっていることが望ましい。この場合、2つの異なる薬剤耐性遺伝子（例えばネオマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子）により二重に選択することが可能となるため、本発明のスクリーニングにおいて擬陽性のES様細胞を選択する可能性が減少し、スクリーニングの成功確度が格段に向上される。

- 15 ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子のダブルノックインマウス (ECAT2<sup>Hygro/Hygro</sup> ECAT3<sup>β<sup>geo</sup>/β<sup>geo</sup></sup>マウス) は、後述の実施例1および3（ただし薬剤耐性遺伝子がハイグロマイシン耐性遺伝子）で作製したECAT2<sup>Hygro/Hygro</sup>マウスとECAT3<sup>β<sup>geo</sup>/β<sup>geo</sup></sup>マウスとを交配されることにより得ることができる。このECAT2<sup>Hygro/Hygro</sup> ECAT3<sup>β<sup>geo</sup>/β<sup>geo</sup></sup>マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞  
20 胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件（例えばMeiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照）で細胞培養し、G418(0.25mg/ml) およびハイグロマイシン (0.1mg/ml) で選択を行う。この選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

- 25 例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418およびハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すこと

により、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化(候補)因子を選択することができる。

#### 例6：融合細胞を用いたスクリーニング

前記本発明の体細胞とES細胞とを融合させた融合細胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件（例えばMeiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照）で細胞培養し、選択マーカーの性質に基づいて選択を行う。体細胞とES細胞とを融合させて生じるES様細胞のコロニー数に比して、被験物質を添加した際にコロニー数が増加した場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用い、マーカーとして薬剤耐性遺伝子を用いる場合は、前記体細胞とES細胞とを融合させた融合細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にて薬剤による選択を行い、生存細胞数を確認する。被験物質を添加しない系に比して生存細胞数（ES様細胞のコロニー数）が増加した場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて融合細胞（若しくは融合前の体細胞）にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化(候補)因子を選択することができる。

本発明のスクリーニングで選択された体細胞核初期化(候補)物質が体細胞の核を初期化するか否かは、(1) 当該核初期化(候補)因子により体細胞から変換されたES様細胞が Oct3/4やEcat4(Nanog) といったES細胞のマーカー遺伝子を発現しているか否か、(2) 前記ES細胞が in vitroにおいてレチノイン酸刺激等で分化するか否か、(3) 前記ES細胞をマウスブラストシストにインジェクションしてキメラマウスが誕生するか等を調べることにより、確認することができる。

#### (2) 本発明の核初期化物質

本発明は、前記本発明のスクリーニング方法を用いて選択される体細胞核初期化物質を提供する。当該核初期化物質は、核酸、ペプチド、タンパク質、有機化合物、無機化合物またはそれらの混合物である。後述の実施例で用いたES細胞も体細胞核初期化物質の1つである。具体的には、ES細胞由来の遺伝子またはタンパク質が例示される。具体例としては、例えばNAT1遺伝子破壊ES細胞由来の遺伝子またはタ

## 4 3

ンパク質が例示される。本発明の核初期化物質は、幹細胞療法において有用である。すなわち、患者から体細胞（組織幹細胞、分化細胞等）を採取し、これに本発明の核初期化物質を添加することにより、ES様細胞が出現する。このES様細胞をレチノイン酸、増殖因子（例えばEGF、FGF-2、BMP-2、LIF等）、またはグルココルチコ  
5 イドなどにより、神経細胞、心筋細胞または血球細胞などに分化させ、これを患者に戻すことにより、幹細胞療法を達成することができる。

(3)本発明のノックインマウスの新規用途（本発明スクリーニング用体細胞の供給源としての使用）

従来、ある遺伝子にマーカー遺伝子をノックインしたノックインマウスは、その  
10 遺伝子の機能解析のために利用されてきた。また場合によっては疾患モデル動物となり得るケースもあった。しかしながら本発明で開示された新たなスクリーニング方法で用いる体細胞の供給源としての利用はなされていない。

本発明は、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するノックインマウスの、本発明のスクリーニングにおいて用いる体細胞の供給源としての  
15 用途を提供するものである。

当該ノックインマウスの作製法等については、前記(1)本発明のスクリーニング方法および後述の実施例において詳しく述べた通りである。当該ノックインマウスは、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子及び/又はECAT5遺伝子を用いる場合は、当該遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を、ホモで含有することが好ましい。一  
20 方、ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を用いる場合はヘテロで含有することが好ましい。マーカー遺伝子としては、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子が挙げられる。中でも薬剤耐性遺伝子を含有する遺伝子が好ましい。

(4)本発明の体細胞

25 本発明は、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞を提供する。

当該体細胞の作製法等については、前記(1)本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニング方法および後述の実施例において詳しく述べた通りである。本発明の体細胞は、前記本発明のスクリーニング方法、または後述の本発明のES様細胞の選択

方法において、有効に使用される。

(5) 本発明のES様細胞の選択方法

本発明はまた、以下の(a)および(b)の工程：

- 5 (a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、  
(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞をES様細胞として選択する工程、  
を含むES様細胞の選択方法を提供する。

10 前記本発明のスクリーニング方法において述べたようなECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた体細胞は、ES様細胞の選択のためにも有効に用いられる。例えば幹細胞療法を念頭においた場合、ヒトの体細胞を核初期化物質で刺激することにより出現したES様細胞を、他の細胞（体細胞）から分離（純化）し、後の治療に用いることが望ましい。前述のように、本発明のシステムは、薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子の発現を指標として、ES様細胞を容易に選択できるシステムであるため、ES様細胞を選択・分離する際に有効  
15 に用いることができる。

ここで「ES様細胞」とは、ES細胞としての性質を有する細胞、すなわち未分化・多能性を有する細胞を意味する。

20 本発明のES様細胞の選択方法は、前記ヒトの治療のみならず、イン・ビトロおよびイン・ビボでのES細胞関連の様々な研究において、ES細胞を選択（分離）する如何なる目的においても使用することができる。

前記において、1) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞の作製方法、2) 当該体細胞と体細胞核初期化物質との接触方法、および3) マーカー遺伝子発現細胞の選択方法については、全て「(1) 本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニング方法」に記述した  
25 ものと同様である。なお、マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子を用いた場合は選択培地で培養することにより、マーカー遺伝子発現細胞を容易に選択（分離）することができる。またマーカー遺伝子として蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、または発色酵素遺伝子を用いた場合は、セルソーター、限界希釈法または軟寒天コロニー法などを利用することにより、当該細胞を選択（分離）する

ことができる。

前記で「核初期化物質」とは前記本発明のスクリーニングで得られるような、体細胞の核初期化に関与する物質を指す。なお、後述の実施例においては、体細胞の核初期化物質としてES細胞自身を用いることにより、マーカー遺伝子発現細胞をES様細胞として選択している。

本発明のES様細胞選択方法においては、如何なるECAT遺伝子（ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子）も使用することができる。具体例として、以下に示した選択方法が例示される。

すなわちECAT2遺伝子を利用した選択方法として、以下の(a)および(b)：

(a) ECAT2遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、  
(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法が例示される。

またECAT3遺伝子を利用した選択方法として、以下の(a)および(b)：

(a) ECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、  
(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法が例示される。

またECAT5遺伝子を利用した選択方法として、以下の(a)および(b)：

(a) ECAT5遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、  
(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法が例示される。

またECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子を利用した選択方法として、以下の(a)および(b)：(a) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、  
(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、

を含むES様細胞の選択方法が例示される。

またECAT4遺伝子を利用した選択方法として、以下の(a)および(b)：

(a) ECAT4遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

5 (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法が例示される。

以上のようなES様細胞の選択方法において用いる体細胞は、ヒトの治療を念頭においた場合は、ECAT遺伝子発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を挿入したベクターを含有するヒト体細胞であることが望ましい。具体的には

10 以下のようにして作製された体細胞が用いられる。

すなわちまず、患者の体細胞をヒトから単離することなどにより調製する。体細胞としては、疾患に関与する体細胞、疾患治療に関与する体細胞などが挙げられる。このヒト体細胞に対し、前記(1-2)の項に記載のいずれかのベクターを導入する。具体的にはBACベクター（ECAT遺伝子の発現調節領域の下流にマーカー遺伝子を存在させたBACベクター）またはPACベクターを導入することが望ましい。ここで導

15 入するBACベクター（PACベクター）は1種類であっても、異なるECAT遺伝子を含有する2種類以上のBACベクターであっても良い。このBACベクター導入細胞に対して核初期化物質を添加することにより、ES様細胞を出現させる。このES様細胞を、用いたマーカー遺伝子の性質に応じて選択する。例えばマーカー遺伝子として薬剤耐

20 性遺伝子を用いた場合は、核初期化物質添加後に選択培地で選択することにより、薬剤耐性を指標として、ES様細胞を容易に選択することができる。

#### (6) 本発明のES様細胞

本発明は、本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニングにより出現したマーカー遺伝子発現細胞（ES様細胞）、および本発明のES様細胞の選択方法により選択さ

25 れたES様細胞を提供する。当該ES様細胞は、その後のインビトロおよびインビボでの評価において有効に用いることができる。すなわち当該ES様細胞の分化誘導能や、分化誘導した細胞の個体（マウス等）への移植定着などを調べることは、ヒトにおける幹細胞療法の予備検討やES細胞に関わる種々の研究において極めて重要である。本発明のES様細胞は、そのような研究や検討において有効に用いられる。



さらに本発明のES様細胞の選択法により出現したヒトのマーカー遺伝子発現細胞（ES様細胞）を、レチノイン酸、増殖因子（例えばEGF、FGF-2、BMP-2、LIF等）、またはグルコルチコイドなどにより、神経細胞、心筋細胞または血球細胞などに分化させ、これを患者に戻すことにより、幹細胞療法を達成することができる。

5 (6) 本発明のES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法

本発明は、以下の(a)および(b)の工程：

(a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

10 (b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の存在の有無を調べ、該細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、を含むES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法を提供する。

ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたES細胞を、ES細胞としての状態（未分化・多能性）を維持できない培地中で  
15 培養した場合、マーカー遺伝子の発現は消失する。一方、前記培地中にES細胞の未分化・多能性維持物質が存在していれば、マーカー遺伝子の発現は存続する。この性質を利用することにより、ES細胞の未分化・多能性維持(候補)物質を容易にスクリーニングすることができる。

前記スクリーニング工程(a)において用いられるES細胞としては、ECAT遺伝子の  
20 発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有するES細胞であればどのようなものであっても良い。具体的には、例えば、前記(1-1-a)に記載されたノックインマウス由来のES細胞、前記(1-1-b)に記載されたトランスジェニックマウス由来のES細胞、前記(1-2-a)に記載されたBACベクター若しくはPACベクターを含有するES細胞、前記(1-2-b)に記載されたプラスミドベクター  
25 を含有するES細胞、若しくは前記(1-2-c)に記載されたターゲティングベクターを含有するES細胞を挙げることができる。また、前述のようにECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞から変換させて生じたES様細胞も、同様に使用することができる（以下においてはES様細胞も含めて「ES細胞」と称する）。

前記スクリーニング工程(a)において用いられる「ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地」とは、ES細胞としての状態を維持できない培地、未分化状態を維持できない培地であれば、どのような培地であっても良い。例えばマウスES細胞は、低密度では、その維持（未分化・多能性維持）に血清またはフィーダー細胞が必須であることが知られているため、当該ES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件が挙げられる。またヒトES細胞の維持（未分化・多能性維持）にはフィーダー細胞が必須であるため、ヒトES細胞の培養条件からフィーダー細胞を除去した条件が挙げられる。さらにヒトES細胞の場合はフィーダー細胞存在下でも分化する細胞が出現するため、フィーダー細胞存在下の培養条件でも良い。

具体的には、文献（Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)）に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件などが例示される。

前記工程(a)は、前記ES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させることにより行われる。被験物質は、ES細胞を未分化・多能性非維持培地に移す前に、また移す際に、若しくは移した後に、当該ES細胞と接触させる。

本スクリーニングで用いられる被験物質（被験試料）は制限されないが、核酸、ペプチド、タンパク質、有機化合物、無機化合物またはこれらの混合物などであり、本発明のスクリーニングは、具体的にはこれらの被験物質を前記ES細胞と接触させることにより行われる。かかる被験物質としては、細胞分泌産物、血清、細胞抽出液、遺伝子（ゲノム、cDNA）ライブラリー、RNAiライブラリー、核酸（ゲノム、cDNA、mRNA）、アンチセンス核酸、低分子化合物、高分子化合物、タンパク質、ペプチド、天然化合物などが挙げられる。具体的には、動物血清またはその画分、フィーダー細胞の分泌産物またはその画分などが挙げられる。

これら被験物質（被験試料）は、体細胞への取り込み可能な形態で体細胞と接触させる。例えば被験物質が核酸（cDNAライブラリー等）の場合は、リン酸カルシウム、DEAE-デキストランや遺伝子導入用リピッドを用いて体細胞に導入する。

マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子を用いた場合は、対応する薬

剤を含む培地（選択培地）で選択を行う。当該薬剤は、ES細胞と被験物質との接触の際に培地に含まれていても良く、また接触後に含ませても良い。さらに被験物質存在下、ES細胞の未分化・多能性非維持培地中で培養した後に前記薬剤を培地に含ませても良い。

- 5       前記工程(a)の後、マーカー遺伝子発現細胞の存在の有無を調べ、該細胞を存在させた被験物質をES細胞の未分化・多能性維持の候補物質として選択する（工程(b)）。当該工程(b)については、前記「(1)本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニング方法」に記載した通りである。マーカー遺伝子発現細胞が認められた場合、ここで用いた被験試料（被験物質）を、ES細胞の未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

- 10       前記スクリーニングは、必要に応じて何度でも繰り返し行うことができる。例えば1回目のスクリーニングでフィーダー細胞分泌産物や血清といった混合物を用いた場合、2回目以降は、さらに当該混合物を細分化（分画）して同様のスクリーニングを繰り返し行うことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持の候補物質を選択することができる。

- 15       なお、前記のように被験試料として混合物を用いてスクリーニングを行った場合、ES細胞の未分化・多能性維持物質と共にES細胞の増殖促進物質も選択される可能性がある。すなわち、ある混合物（画分A）を前記本発明のスクリーニング方法に供し、生存細胞が確認され且つ当該生存細胞の細胞数が増加した場合には、当該画分中には、ES細胞の未分化・多能性維持物質と共に、ES細胞の増殖促進物質も含まれていると考えられる（もちろん1つの物質が両方の性質を兼ね備えている場合もある）。その場合、当該画分Aをさらに分画し、片方の画分（画分B）を本発明のスクリーニングに供した場合には生存細胞が確認されるが細胞数の増加は認めらず、もう片方の画分（画分C）を本発明のスクリーニングに供した場合は生存細胞が認められなかった場合、画分BにはES細胞の未分化・多能性維持物質が含まれ、画分CにはES細胞の増殖促進物質が含まれることが考えられる。本発明のスクリーニングは、そのようなES細胞の増殖促進（候補）物質の選択にも有用である。

25       以下、前記スクリーニング方法の具体例として、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子およびECAT5遺伝子を利用したスクリーニング方法につき例示するが、い

ずれのECAT遺伝子（ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子）についても以下を参考にして同様に実施することができる。

例1：ECAT2遺伝子を利用したスクリーニング

5        ECAT2遺伝子を利用したES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)および(b)：

(a) ECAT2遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

10        (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、を含むスクリーニング方法が例示される。

後述の実施例に示したように、ECAT2遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子ではない。従って、ECAT2遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたES細胞  
15        を用いて本発明のスクリーニングを行うことが好ましい。当該ES細胞は、例えば実施例3に記載の方法で作製することができる（ECAT2遺伝子ホモ変異RF8 ES細胞）。このES細胞を、被験物質存在下、文献（Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)）に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件で培養する。その後G418及び／又は  
20        ハイグロマイシンで選択を行う。これらの薬剤による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、ES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてフィーダー細胞分泌産物を用いる場合は、前記ES細胞に対してフィーダー細胞分泌産物を添加し、前記手法にてG418及び／又はハイグロマイ  
25        シンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その分泌産物をさらに幾つかの画分に分けてES細胞に添加する。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持(候補)因子を選択することができる。また併せて生細胞数の増加を指標としてES細胞の増殖促進(候補)物質を選択することもできる。

例2：ECAT3遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT3遺伝子を利用したES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)および(b)：

(a) ECAT3遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含むES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、を含むスクリーニング方法が例示される。

後述の実施例に示したように、ECAT3遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子ではない。従って、ECAT3遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたES細胞を用いて本発明のスクリーニングを行うことが好ましい。当該ES細胞は、例えば、実施例1で作製した $\beta$  geoベクターとの相同組み換えES細胞に対して、さらにHygroベクター（ECAT3遺伝子をHygro遺伝子で置き換えるためのターゲッティングベクター）を導入することにより、ECAT3遺伝子がホモ変異となったES細胞を作製することができる。この細胞を、被験物質存在下、文献（Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)）に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件で培養する。その後G418及び／又はハイグロマイシンで選択を行う。これらの薬剤による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、ES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてフィーダー細胞分泌産物を用いる場合は、前記ES細胞に対してフィーダー細胞分泌産物を添加し、前記手法にてG418及び／又はハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その分泌産物をさらに幾つかの画分に分けてES細胞に添加する。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持(候補)因子を選択することができる。また併せて生細胞数の増加を指標としてES細胞の増殖促進（候補）物質を選択することもできる。

例3：ECAT4遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT4遺伝子を利用したES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)および(b)：

(a) ECAT4遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含むES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、を含むスクリーニング方法が例示される。

ECAT遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子である。従って、ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をヘテロでノックインしたES細胞を用いて本発明のスクリーニングを行うことが好ましい。

ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をヘテロでノックインしたES細胞は、前記ECAT2やECAT3と同様にターゲッティングベクター（例えばECAT4遺伝子を $\beta$ geo遺伝子で置き換えるためのターゲッティングベクター）をES細胞に導入・相同組み換えを起こすことにより作製することができる。この細胞を、被験物質存在下、文献（Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)）に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件で培養する。その後G418で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、ES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてフィーダー細胞分泌産物を用いる場合は、前記ES細胞に対してフィーダー細胞分泌産物を添加し、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その分泌産物をさらに幾つかの画分に分けてES細胞に添加する。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持(候補)因子を選択することができる。また併せて生細胞数の増加を指標としてES細胞の増殖促進(候補)物質を選択することもできる。

#### 例4：ECAT5遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT5遺伝子を利用したES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)および(b)：

(a) ECAT5遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

5 (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、を含むスクリーニング方法が例示される。

後述の実施例に示したように、ECAT5遺伝子はES細胞の維持に必須の因子ではない。従って、ECAT5遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたES細胞を用いて本発明のスクリーニングを行うことが好ましい。当該ES細胞の作製法およびそれを  
10 用いたスクリーニング法は、前記ECAT2やECAT3の場合と同様である。

前記本発明のスクリーニングにより選択されたES細胞の未分化・多能性維持(候補)物質がES細胞の未分化・多能性を維持するか否かは、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中に当該候補物質を添加した培養条件下でES細胞を培養し、ES細胞としての種々の能力を調べることにより、確認することができる。具体的には  
15 、例えば前記培養条件下で培養したES細胞が、(1) Oct3/4やEcat4(Nanog)といったES細胞のマーカー遺伝子を発現しているか否か、(2) 前記ES細胞が *in vitro*においてレチノイン酸刺激等で分化するか否か、(3) 前記ES細胞をマウスブラストシストにインジェクションしてキメラマウスが誕生するか等を調べることにより、確認することができる。

20 (7) 本発明のES細胞未分化・多能性維持物質

本発明は前記スクリーニング方法を用いて選択されるES細胞未分化・多能性維持物質を提供する。当該ES細胞の未分化・多能性維持物質は、核酸、ペプチド、タンパク質、有機化合物、無機化合物のいずれかであり、好ましくは、フィーダー細胞分泌産物または血清由来成分が例示される。本発明のES細胞未分化・多能性維持物質は、ES細胞の臨床応用において有用である。すなわち臨床応用においては、ヒト  
25 ES細胞またはそれから分化させた分化細胞を無血清下、フィーダー細胞非存在下で培養することが必須となるため、本発明のES細胞未分化・多能性維持物質の無血清培地への添加により、前記ES細胞の臨床応用が可能となる。

(8) 本発明のノックインマウスの新規用途(本発明スクリーニング用ES細胞の供

給源としての使用)

本発明は、本発明のノックインマウスの、ES細胞未分化・多能性維持物質スクリーニング用のES細胞の供給源としての用途を提供する。本発明のノックインマウスについては前記(3)に記載した通りである。ノックイン MausからのES細胞の単離は、当業者に周知の手法により行うことができる。

#### (9) 本発明のES細胞

本発明は、ECAAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含むES細胞を提供する。当該ES細胞の作製法等については、前記(1)および(6)において詳しく述べたとおりである。本発明のES細胞は、ES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法において有効に使用される。

### 実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

#### 実施例 1

##### ECAT3遺伝子を利用したES類似細胞の選択システム

ECAT3遺伝子のコーディング領域を $\beta$ ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子( $\beta$ geo)に置き換え、ECAT3遺伝子をノックアウトするとともに、ECAT3遺伝子の発現をX-Gal染色や薬剤耐性でモニターできるようにしたホモ変異ノックインマウス(以下、ECAT3 $^{\beta$ geo/ $\beta$ geoマウス)を作製した。このECAT3 $^{\beta$ geo/ $\beta$ geoマウスの作製は文献(Tokuzawa, Y., et al., Molecular and Cellular Biology, 23(8): 2699-2708(2003))の記載に基づき行った。簡単に述べると以下のようになる。

まず、マウスECAT3遺伝子を含むBACクローンを、ECAT3 cDNAの一部をプライマーに用いたPCRスクリーニングにより、BACライブラリー(Research Genetics)のDNAプールから同定し、塩基配列を決定した。

マウスECAT3遺伝子のエクソン3〜エクソン7を、IRES- $\beta$ geoカセット(Mountford et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4303-4307(1994))で置き換えるためのター



ゲッティングベクターを以下のように作製した。ECAT3のイントロン1～エクソン3を含有する1.4kbフラグメントを、前記マウスBAC DNAを鋳型とし、プライマー（ACCAAGGTCACCGCATCCAA（配列番号：43）、CTTCACCAAGATTTCGATG（配列番号：44））を用いてPCRにより増幅することにより5'側アームを作製した。またエクソン7～エクソン8を含有する3.5kbフラグメントを、マウスBAC DNAを鋳型とし、プライマー（GAATGGTGGACTAGCTTTTG（配列番号：45）、TGCCATGAATGTCGATATGCAG（配列番号：46））を用いてPCRにより増幅することにより3'側アームを作製した。これら5'側アームと3'側アームを $\beta$ geoカセットにライゲートし、ターゲッティングベクターを作製した。このターゲッティングベクターをNotIで切断し、エレクトロポレーションによりRF8 ES細胞（Meiner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046 (1996)）に導入した。G418選択培地にて、相同組み換えが正しく起こったクローンを選択した。この $\beta$ geoとの相同組み換えES細胞をマウス（C57BL/6）のブラストシストにインジェクションすることによりキメラマウスを経てヘテロ変異マウス（ECAT3 <sup>$\beta$  geo/+</sup>マウス）を樹立し、さらにヘテロ変異マウス同士の交配から、ホモ変異マウス（ECAT3 <sup>$\beta$  geo/ $\beta$  geo</sup>マウス）がメンデルの法則に従って誕生した。

次に、ECAT3 <sup>$\beta$  geo/ $\beta$  geo</sup>マウスの胸腺から常法によりリンパ球を採取した。この細胞を文献（Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046 (1996)）に記載のES細胞の培養条件で2日間培養し、G418（0.25mg/ml）で選択した。その結果、これらリンパ球はすべて死滅し、薬剤耐性コロニーは一つも得られなかった。またこのG418濃度では正常ES細胞はすべて死滅することも確認された。

次に、ECAT3 <sup>$\beta$  geo/ $\beta$  geo</sup>マウス由来のリンパ球とRF8細胞とを、多田らの方法（Tada, M., et al., Curr. Biol., 11(19): p1553-1558 (2001)）に従って電氣的に融合し、前記ES細胞の培養条件でフィーダー細胞（STO細胞）上で2日間培養し、G418（0.25mg/ml）で選択したところ、多数のES細胞様コロニーが得られた。これらのコロニーを単離、培養し、RNAを回収した。ノザンブロットによりこれらの細胞は全クローンにおいてOct3/4やECAT4（Nanog）を発現しており、またこのクローンをマウスブラストシストに移植したところキメラマウスが形成されたことから、G418で選択された細胞は確かにES細胞としての性質を有するES様細胞であることが明ら

かとなった（図1）。これらの細胞をフローサイトメトリー（FACS）で解析したところ、大きさ（Forward scatter）は約2倍となり、DNA量も4倍体となっていた（図2）。以上のことから、これらのコロニーはECAT3 <sup>$\beta$ geo/ $\beta$ geo</sup>マウス由来のリンパ球と正常ES細胞との融合により、リンパ球核の初期化（ES細胞化）が起こったためにG418耐性になったことが分かった。このようにECAT3 <sup>$\beta$ geo/ $\beta$ geo</sup>マウス由来の体細胞は、ES様細胞に変換された時のみ薬剤耐性となる。従ってこの性質を利用すれば、ES様細胞の選択や、ES様細胞への変換を誘導する核初期化因子を容易にスクリーニングできることが明らかとなった。

## 実施例2

### 10 ECAT5遺伝子を利用したES類似細胞の選択システム

ECAT5遺伝子のコーディング領域を $\beta$ geoに置き換えたホモ変異ノックインマウス（ECAT5 <sup>$\beta$ geo/ $\beta$ geo</sup>マウス）を文献（Takahashi, K., K. Mitsui, and S. Yamanaka, Nature, 423(6939): p541-545 (2003)、特開2003-265166号公報）記載の方法に基づき作製した。このECAT5 <sup>$\beta$ geo/ $\beta$ geo</sup>マウス由来のリンパ球を用いて、上記と同様のプロトコールで実験を行った。ECAT5 <sup>$\beta$ geo/ $\beta$ geo</sup>マウス2x10<sup>6</sup>個のリンパ球を4x10<sup>5</sup>個のES細胞と融合し、G418で選択培養したところ、実施例1で行ったECAT3の場合よりは数が少ないものの、同様のES細胞様コロニーが得られた。よってECAT5も同様にES様細胞の選択システムに利用できることが分かった。

なおECAT3の場合よりもコロニー数が少なかった理由としては、ES細胞に極めて特異的に発現するという観点からは両者は同じであるものの、ECAT3はES細胞の維持や増殖にとっては必須ではないのに対し、ECAT5はES細胞の増殖を促進する因子であるため、その遺伝子量の減少（ノックアウト）はES細胞化にとって不利になっていることが考えられた。

## 実施例3

### 25 ECAT2遺伝子を利用したES類似細胞の選択システム

ECAT2遺伝子がES細胞で特異的に発現することは、既にノザンブロット解析により明らかになっている（WO 02/097090 号公報参照）。さらに詳細な発現解析をRT-PCRにより行ったところ、未分化ES細胞での特異的な発現が確認された（図3A）。またサイクル数を増やすことにより精巣、および卵巣でも発現するが体組織では

全く発現が認められなかった（図3B）。

マウスECAT2ゲノム配列を、公的データベースであるMouse Genome Resources (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/mouse/>)により同定した。このECAT2ゲノムを含有するBACクローンをPCRとサザンハイブリダイゼーションによりクローニ  
5      ングした。

ECAT2遺伝子をノックアウトするためにエクソン1～3を $\beta$  geo（ $\beta$  ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子）またはHygro（ハイグロマイシン耐性遺伝子）と置換するためのターゲッティングベクターを作製した。すなわち、マウスECAT2遺伝子のエクソン1～3をIRES（internal ribosome entry site）- $\beta$  geoカ  
10      セット若しくはIRES- Hygroカセットで置換するようにデザインしたターゲッティングベクターを作製した。

具体的にはまず、マウスECAT2ゲノムの5' flanking領域～エクソン1の領域を含有するフラグメントと、エクソン3～3' flanking領域を含有するフラグメントを、それぞれ前記BACクローンを鋳型としたPCRにより増幅し、これらをそれぞれターゲ  
15      ッティングベクターの5'-アームおよび3'-アームとした。5'-アームはプライマー（CCGCGGAAAGTCAAGAGATTGGGTGG（配列番号：47）、GCGGCCGCCTTTACGGGTCACGAGGGTCAC（配列番号：48））により増幅し、3'-アームはプライマー（TGTGGCCAGTGTTTGGTTCTG  
GCGGG（配列番号：49）、CTCGAGGACTCGCCATTCTAGCCAAG（配列番号：50））により増幅した。得られた2つの増幅断片をpBSSK(-)-IRES- $\beta$  geoまたはpBSSK(-)-IRES-Hygroの IRES- $\beta$  geoカセット若しくはIRES- Hygroカセットにライゲーションすること  
20      によりターゲッティングベクターを完成し、これをSacII で切断して直鎖化した。

前記ターゲッティングベクターによるECAT2遺伝子破壊の概略を図4に示す。

直鎖化したターゲッティングベクターをエレクトロポレーションによりRF8ES細胞（Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046 (1996)）に導入  
25      し、各薬剤（ $\beta$  geoの場合はネオマイシン（G418）、Hygroの場合はハイグロマイシン）により選択した。相同組み換えが正しく起こっていることの確認はサザンブロットにて行った。すなわち、前記ES細胞から抽出したゲノムDNAをPstIで切断後、電気泳動し、ナイロンメンブランへ転写した。これをECAT2遺伝子の3'領域のプローブとハイブリダイゼーションさせた。正常ゲノムからは18kbpのバンド、 $\beta$  geo

ベクターとの相同組み換えでは13kbpのバンド、そしてHygroベクターとの相同組み換えでは9kbpのバンドが検出される。結果を図5に示す。各薬剤耐性ES細胞において相同組換えが正しく起こっていることが確認された。

さらにHygroベクターとの相同組み換えES細胞に $\beta$  geoベクターを導入し、ネオマイシンで選択したところ、両者で相同組み換えが起こった、すなわちECAT2遺伝子がホモ変異となったES細胞を3クローン得ることが出来た。 $\beta$  geoベクターとHygroベクターの両者で正しく相同組換えが起こっていることは前記と同様のサザンブロットにより確認した(図5)。またノザンブロットにより、これらのクローンはECAT2の発現が消失していることが確認できた(図6)。

このホモ変異ES細胞がES細胞としての機能を保持しているかどうかを調べたところ、形態、増殖、分化能すべてが正常であった。以上の結果から、ECAT2はES細胞、精巣、卵巣に特異的に発現するが、ESの維持や初期発生には必須でない因子であることが分かった。従って、ECAT3遺伝子と同様にES細胞の選択に極めて有効に利用できることが明らかとなった。

次に、 $\beta$  geoとの相同組み換えES細胞をマウス(C57BL/6)のプラストシストにインジェクションすることによりキメラマウスを経てヘテロ変異マウスを樹立した。さらにヘテロ変異マウス同士の交配から、ホモ変異マウスがメンデルの法則に従って誕生した。このホモ変異マウス由来の体細胞を用いて、実施例1と同様のプロトコールで実験を行うことにより、実施例1と同様にES細胞様コロニーを得ることができる。

すなわち、ECAT2 <sup>$\beta$  geo/ $\beta$  geo</sup>マウスの胸腺から常法によりリンパ球を採取し、実施例1と同様のプロトコールでこのリンパ球とES細胞(RF8細胞)とを融合し、G418で選択培養したところ、実施例1と同様に多数のES細胞様コロニーが得られた。従ってECAT2もECAT3と同様に核初期化因子のスクリーニング等に利用できることが分かった。

#### 実施例4

##### ECAT4ホモ変異ES細胞を用いた体細胞核初期化物質のスクリーニング

文献(Mitsui, K., et al., Cell, 113: 631-642(2003)) およびWO 2004/067744)に基づき、ECAT4遺伝子がホモ変異したES細胞(ECAT4遺伝子が $\beta$  geoベクター及び

Hygroベクターの両者でノックインされたRF8 ES細胞) を作製した。このECAT4ホモ変異ES細胞は、未分化・多能性を維持していないこと、すなわち分化していることが知られている(Cell, 113: 631-642(2003)、WO 2004/067744)。この細胞に対してECAT4遺伝子を含有するレトロウイルスベクターを感染させ、細胞内でECAT4を正常に発現させたが、ES細胞としての機能(未分化・多能性)は回復しなかった。この結果より、ECAT4のみでは分化したES細胞の核初期化を行うことはできないことが明らかとなった。

文献(Cell, 113: 631-642(2003)、WO 2004/067744)に記載のように、ECAT4はES細胞としての機能(未分化・多能性)維持に必須の因子であることから、ECAT4をノックアウトし、かつECAT4を供給した前記ES細胞は、ES細胞に近い状態の分化細胞であると言える。よってこの細胞に被験物質を接触させるスクリーニング系は、核初期化物質がより見出し易い、効率的なスクリーニング系であると考えられた。

前記ECAT4ホモ変異ES細胞を用いた体細胞核初期化物質のスクリーニングは、以下のようにして行う。

まず、前記ECAT4ホモ変異ES細胞に対してECAT4遺伝子発現ベクターを導入し、細胞内にECAT4を供給する。次に被験物質を添加し、ES細胞の培養条件(例えばMeiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照)で細胞培養し、G418及び/又はハイグロマイシンで選択を行う。当該選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、まず前記体細胞(ECAT4ホモ変異ES細胞)に対してECAT4遺伝子を導入する。その後リポフェクション法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418及び/又はハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化(候補)因子を選択することができる。

#### 実施例 5

#### 体細胞核初期化因子探索のソースとしてのcDNAライブラリー

文献 (Yamanaka, S. et al., Embo J., 19, 5533-5541 (2000)) に基づき、NAT1 遺伝子ノックアウト ES 細胞を作製した。当該 ES 細胞は、ネオマイシン耐性遺伝子を持ったターゲティングベクターを用いて作製したため G418 耐性である。しかし用いたネオマイシン耐性遺伝子が 2 つの LoxP 配列で囲まれていることを利用して、同細胞

5 に CRE 遺伝子を発現させることによりネオマシシン耐性遺伝子を除去し、再び G418 感受性となった NAT1 遺伝子ノックアウト ES 細胞を樹立した。この細胞を用いて ECAT3 ノックインマウス由来の胸腺細胞と細胞融合を行った結果、融合の効率は正常 ES 細胞と顕著な差を認めなかった (図 7、8)。しかし G418 で選択を行った後の ES 細胞様コロニーの出現頻度は、正常 ES 細胞を用いた時に比べて有意に増強した (図 9)

10 。以上の結果は、NAT1 遺伝子ノックアウト ES 細胞は正常 ES 細胞より未分化度が高いだけではなく、核初期化活性も高いことを示しており、核初期化因子の機能的クローニングに用いる cDNA ライブラリーの由来として有効であることが示された。

NAT1 遺伝子ノックアウト ES 細胞から市販の cDNA ライブラリー作製キットを用いて cDNA ライブラリーを作製する。次に ECAT3 <sup>$\beta$  gco /  $\beta$  gco</sup> マウスや ECAT2 <sup>$\beta$  gco /  $\beta$  gco</sup> マウス等に由来する体細胞に対して、リポフェクチン法等の公知の手法で前記 cDNA ライブラリー由来の cDNA プールをトランスフェクトし、G418 で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その cDNA プールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES 細胞由来の体細胞核初期化 (候補) 因子を選択することができる。

## 20 実施例 6

### ECAT3 <sup>$\beta$ gco / $\beta$ gco</sup> マウス由来の体細胞を用いた体細胞核初期化物質のスクリーニング

ECAT3 <sup>$\beta$  gco /  $\beta$  gco</sup> マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、文献 (Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Aca

25 d. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046 (1996)) 等に記載の ES 細胞の培養条件で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択を行う。G418 による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質として ES 細胞由来の cDNA ライブラリーを用いる場合は、前記体細

胞に対してリポフェクション法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化（候補）因子を選択することができる。

#### 実施例 7

#### ECAT2 <sup>$\beta$ g<sup>g</sup>o / $\beta$ g<sup>g</sup>o</sup> マウス由来の体細胞を用いた体細胞核初期化物質のスクリーニング

ECAT2 <sup>$\beta$  g<sup>g</sup>o /  $\beta$  g<sup>g</sup>o</sup> マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、文献（Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046 (1996)）等に記載のES細胞の培養条件で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクション法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化（候補）因子を選択することができる。

#### 実施例 8

#### ECAT2<sup>Hygro / Hygro</sup>・ECAT3 <sup>$\beta$ g<sup>g</sup>o / $\beta$ g<sup>g</sup>o</sup> ダブルノックインマウス由来の体細胞を用いた体細胞核初期化物質のスクリーニング

ECAT2<sup>Hygro / Hygro</sup>・ECAT3 <sup>$\beta$  g<sup>g</sup>o /  $\beta$  g<sup>g</sup>o</sup> ダブルノックインマウスはECAT2<sup>Hygro / Hygro</sup> マウスとECAT3 <sup>$\beta$  g<sup>g</sup>o /  $\beta$  g<sup>g</sup>o</sup> マウスを交配させることにより得ることができる。このダブルノックインマウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、文献（Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046 (1996)）等に記載のES細胞の培養条件で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) およびハイグロマイシン (0.1mg/ml) で選択を行う

。2つの薬剤による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にて薬剤選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化(候補)因子を選択することができる。

#### 実施例9

#### ECAT2遺伝子ホモ変異ES細胞を用いたES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング

実施例3で作製したECAT2遺伝子がホモ変異となったRF8 ES細胞を、被験物質存在下、文献 (Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)) に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件で培養する。その後G418 (0.25mg/ml) 及び/又はハイグロマイシン (0.1mg/ml) で選択を行う。これら薬剤による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、ES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてフィーダー細胞分泌産物を用いる場合は、前記ES細胞に対してフィーダー細胞分泌産物を添加し、前記手法にてG418及び/又はハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その分泌産物をさらに幾つかの画分に分けてES細胞に添加する。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持(候補)因子を選択することができる。

#### 実施例10

#### ECAT3遺伝子ホモ変異ES細胞を用いたES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング

実施例1で作製した $\beta$ geoベクターとの相同組み換えES細胞に対して、さらにHygroベクター (ECAT3遺伝子をHygro遺伝子で置き換えるためのターゲッティングベク



ター)を導入し、ECAT3遺伝子がホモ変異となったRF8 ES細胞を作製する。この細胞を、被験物質存在下、文献(Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996))に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件で培養する。その後G418 (0.25mg/ml) 及び  
5 /又はハイグロマイシン (0.1mg/ml) で選択を行う。これらの薬剤による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、ES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてフィーダー細胞分泌産物を用いる場合は、前記ES細胞に対してフィーダー細胞分泌産物を添加し、前記手法にてG418及び/又はハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その  
10 分泌産物をさらに幾つかの画分に分けてES細胞に添加する。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持(候補)因子を選択することができる。

#### 15 産業上の利用可能性

本発明により、体細胞核初期化物質の効率的なスクリーニング方法が提供される。核初期化物質は、幹細胞療法を現実化するために極めて重要な物質であり、本発明のスクリーニング方法により、そのような核初期化物質の早期発見が可能となる。  
。さらに本発明により、ES細胞未分化・多能性維持物質の効率的なスクリーニング  
20 方法が提供される。ES細胞未分化・多能性維持物質はES細胞の臨床応用において極めて重要な物質であり、本発明のスクリーニング方法により、そのようなES細胞未分化・多能性維持物質の早期発見が可能となる。

#### 配列表フリーテキスト

25 配列番号：39に記載の塩基配列はプライマーである。

配列番号：40に記載の塩基配列はプライマーである。

配列番号：41に記載の塩基配列はプライマーである。

配列番号：42に記載の塩基配列はプライマーである。

配列番号：43に記載の塩基配列はプライマーである。

配列番号：44に記載の塩基配列はプライマーである。

配列番号：45に記載の塩基配列はプライマーである。

配列番号：46に記載の塩基配列はプライマーである。

配列番号：47に記載の塩基配列はプライマーである。

5 配列番号：48に記載の塩基配列はプライマーである。

配列番号：49に記載の塩基配列はプライマーである。

配列番号：50に記載の塩基配列はプライマーである。

## 請求の範囲

1. 以下の (a) および (b) の工程を含む、体細胞の核初期化物質のスクリーニング方法：

5 (a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

10 2. ECAT遺伝子が、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、請求項1記載のスクリーニング方法。

15 3. マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項1または2記載のスクリーニング方法。

4. 体細胞が、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞である、請求項1～3いずれか記載のスクリーニング方法。

5. 体細胞が、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞である、請求項4記載のスクリーニング方法。

20 6. ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、請求項4または5記載のスクリーニング方法。

25 7. 以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項1記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT2遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

8. 以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 1 記載のスクリーニング方法：

(a) E C A T 3 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含む体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

5 (b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

9. 以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 1 記載のスクリーニング方法：

10 (a) E C A T 5 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含む体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

10. 以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 1 記載のスクリーニング方法：

15 (a) E C A T 2 遺伝子および E C A T 3 遺伝子に、それぞれ薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含む体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

20 11. E C A T 2 遺伝子と E C A T 3 遺伝子が、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子でノックインされている、請求項 10 記載のスクリーニング方法。

12. 体細胞が、E C A T 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞である、請求項 7～11 いずれか記載のスクリーニング方法。

25 13. 以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 1 記載のスクリーニング方法：

(a) E C A T 4 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含む体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞

## 67

を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

14. 体細胞が、ECAT4遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有する体細胞である、請求項13記載のスクリーニング方法。

5 15. 以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項13記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT4遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞にECAT4を供給し、被験物質を接触させる工程、

10 (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

16. 体細胞が、ECAT4遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞である、請求項15記載のスクリーニング方法。

15 17. 請求項1～16いずれか記載のスクリーニング方法を用いて選択される核初期化物質。

18. ES細胞由来の遺伝子またはタンパク質である、請求項17記載の核初期化物質。

19. ES細胞がNAT1遺伝子破壊ES細胞である、請求項18記載の核初期化物質。

20 20. NAT1遺伝子破壊ES細胞に由来する物質。

21. cDNAライブラリー、タンパク質ライブラリー、または細胞抽出物である、請求項20記載の物質。

22. ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するノックインマウスの、請求項1～16いずれか記載のスクリーニング方法において用いる体細胞の供給源としての使用。

23. ノックインマウスが、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するノックインマウスである、請求項22記載の使用。

24. ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子

、ECAT 8 遺伝子、ECAT 9 遺伝子およびOct 3 / 4 遺伝子から選択される  
1 または 2 以上の遺伝子である、請求項 22 または 23 記載の使用。

25. マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺  
伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項 22  
5 ～ 24 いずれか記載の使用。

26. ECAT 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺  
伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞。

27. ECAT 遺伝子が ECAT 1 遺伝子、ECAT 2 遺伝子、ECAT 3 遺伝  
子、ECAT 4 遺伝子、ECAT 5 遺伝子、ECAT 6 遺伝子、ECAT 7 遺伝  
10 子、ECAT 8 遺伝子、ECAT 9 遺伝子およびOct 3 / 4 遺伝子から選択される  
1 または 2 以上の遺伝子である、請求項 26 記載の体細胞。

28. マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺  
伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項 26  
または 27 記載の体細胞。

15 29. ECAT 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する、請  
求項 26 ～ 28 いずれか記載の体細胞。

30. ECAT 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有す  
る、請求項 29 記載の体細胞。

31. ECAT 4 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有  
20 する分化ES細胞である、請求項 30 記載の体細胞。

32. ECAT 4 が細胞内に供給された、請求項 31 記載の体細胞。

33. 以下の (a) および (b) の工程を含む、ES 様細胞の選択方法：

(a) ECAT 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺  
伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる  
25 工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞をES様細胞として選択す  
る工程。

34. ECAT 遺伝子が、ECAT 1 遺伝子、ECAT 2 遺伝子、ECAT 3 遺  
伝子、ECAT 4 遺伝子、ECAT 5 遺伝子、ECAT 6 遺伝子、ECAT 7 遺伝

子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、請求項33記載の選択方法。

35. マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項33または34記載の選択方法。

36. 以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項33記載の選択方法：

(a) ECAT2遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

10 (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程。

37. 以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項33記載の選択方法：

(a) ECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

15 (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程。

38. 以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項33記載の選択方法：

(a) ECAT5遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程。

39. 以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項33記載の選択方法：

25 (a) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程。

## 70

40. ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子が存在する、請求項39記載の選択方法。

41. 以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項33記載の選択方法：

5 (a) ECAT4遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程。

10 42. 請求項26～32いずれか記載の体細胞の、請求項1～16いずれか記載のスクリーニング方法または請求項33～41いずれか記載の選択方法における使用。

43. 請求項1～16いずれか記載のスクリーニング方法において出現したマーカー遺伝子発現細胞または生存細胞、若しくは請求項33～41いずれか記載の選択方法において選択されたES様細胞。

44. 以下の(a)および(b)の工程を含む、ES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法：

20 (a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の存在の有無を調べ、該細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

25 45. ECAT遺伝子が、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、請求項44記載のスクリーニング方法。

46. マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項44



または45記載のスクリーニング方法。

47. ES細胞が、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞である、請求項44～46いずれか記載のスクリーニング方法。

5 48. ES細胞が、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するES細胞である、請求項47記載のスクリーニング方法。

49. ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、請求項47または48記載のスクリーニング方法  
10 。

50. 以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項44記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT2遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、  
15

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

51. 以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項44記載のスクリーニング方法：  
20

(a) ECAT3遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。  
25

52. 以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項44記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT5遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を

含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

53. 以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項44記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子に、それぞれ薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

54. ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子が、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子でノックインされている、請求項53記載のスクリーニング方法。

55. ES細胞が、ECAT遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するES細胞である、請求項50～54いずれか記載のスクリーニング方法。

56. 以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項44記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT4遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

57. ES細胞が、ECAT4遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有するES細胞である、請求項56記載のスクリーニング方法。

## 7 3

5 8. 請求項 4 4～5 7いずれか記載のスクリーニング方法を用いて選択される E S 細胞の未分化・多能性維持物質。

5 9. フィーダー細胞の分泌産物である、請求項 5 8 記載の E S 細胞の未分化・多能性維持物質。

5 6 0. 血清由来成分である、請求項 5 8 記載の E S 細胞の未分化・多能性維持物質。

6 1. E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するノックインマウスの、請求項 4 4～5 7いずれか記載のスクリーニング方法において用いる E S 細胞の供給源としての使用。

10 6 2. ノックインマウスが、E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するノックインマウスである、請求項 6 1 記載の使用。

6 3. E C A T 遺伝子が E C A T 1 遺伝子、E C A T 2 遺伝子、E C A T 3 遺伝子、E C A T 4 遺伝子、E C A T 5 遺伝子、E C A T 6 遺伝子、E C A T 7 遺伝子、E C A T 8 遺伝子、E C A T 9 遺伝子および O c t 3 / 4 遺伝子から選択される  
15 1 または 2 以上の遺伝子である、請求項 6 1 または 6 2 記載の使用。

6 4. マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項 6 1  
～6 3 いずれか記載の使用。

6 5. E C A T 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する E S 細胞。  
20

6 6. E C A T 遺伝子が E C A T 1 遺伝子、E C A T 2 遺伝子、E C A T 3 遺伝子、E C A T 4 遺伝子、E C A T 5 遺伝子、E C A T 6 遺伝子、E C A T 7 遺伝子、E C A T 8 遺伝子、E C A T 9 遺伝子および O c t 3 / 4 遺伝子から選択される  
1 または 2 以上の遺伝子である、請求項 6 5 記載の E S 細胞。

25 6 7. マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項 6 5 または 6 6 記載の E S 細胞。

6 8. E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する、請求項 6 5～6 7 いずれか記載の E S 細胞。

74

69. ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する、請求項68記載のES細胞。

70. 請求項65～69いずれか記載のES細胞の、請求項44～57いずれか記載のスクリーニング方法における使用。

1/8

図 1

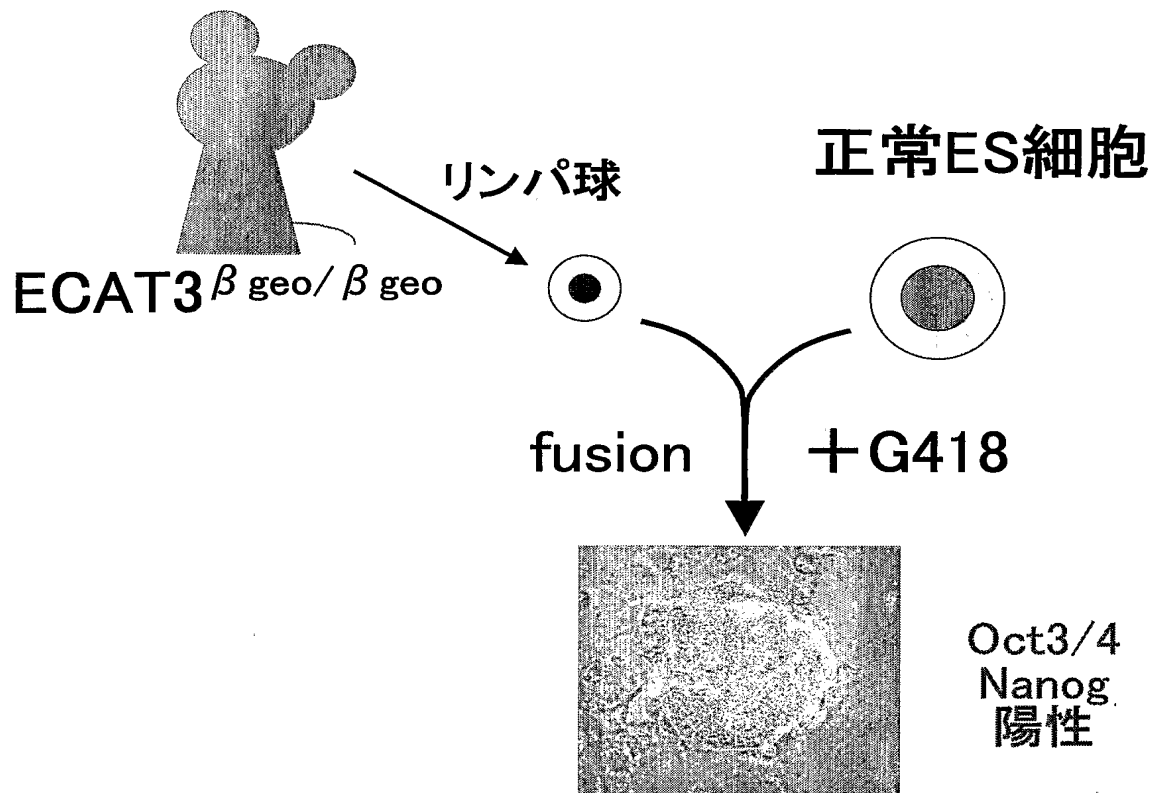
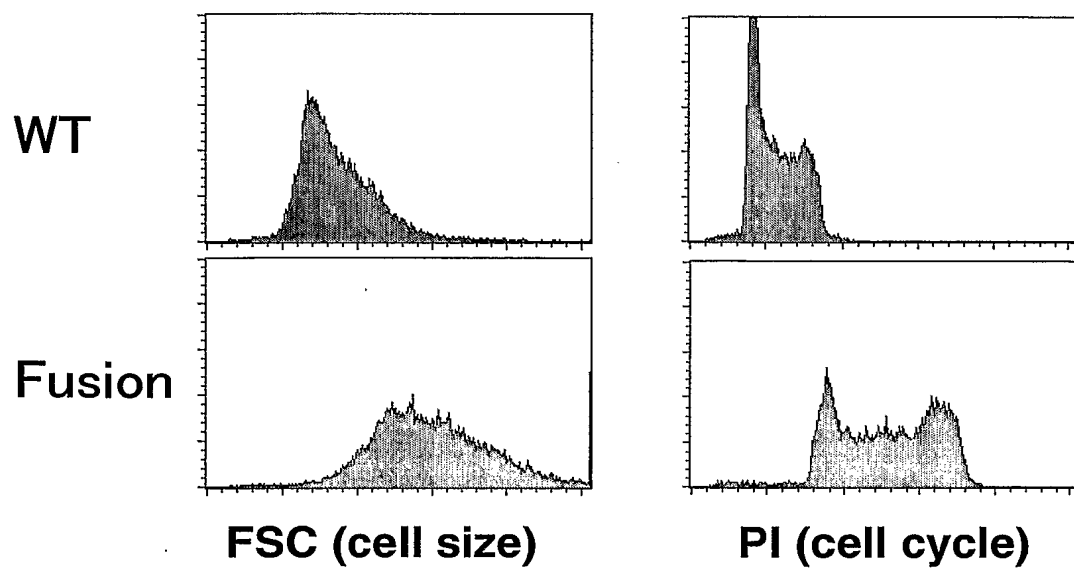


図 2



2/8

☒ 3

(A) X25 cycles

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

ESG1



NAT1

positive control



(B) X30 cycles

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

ESG1



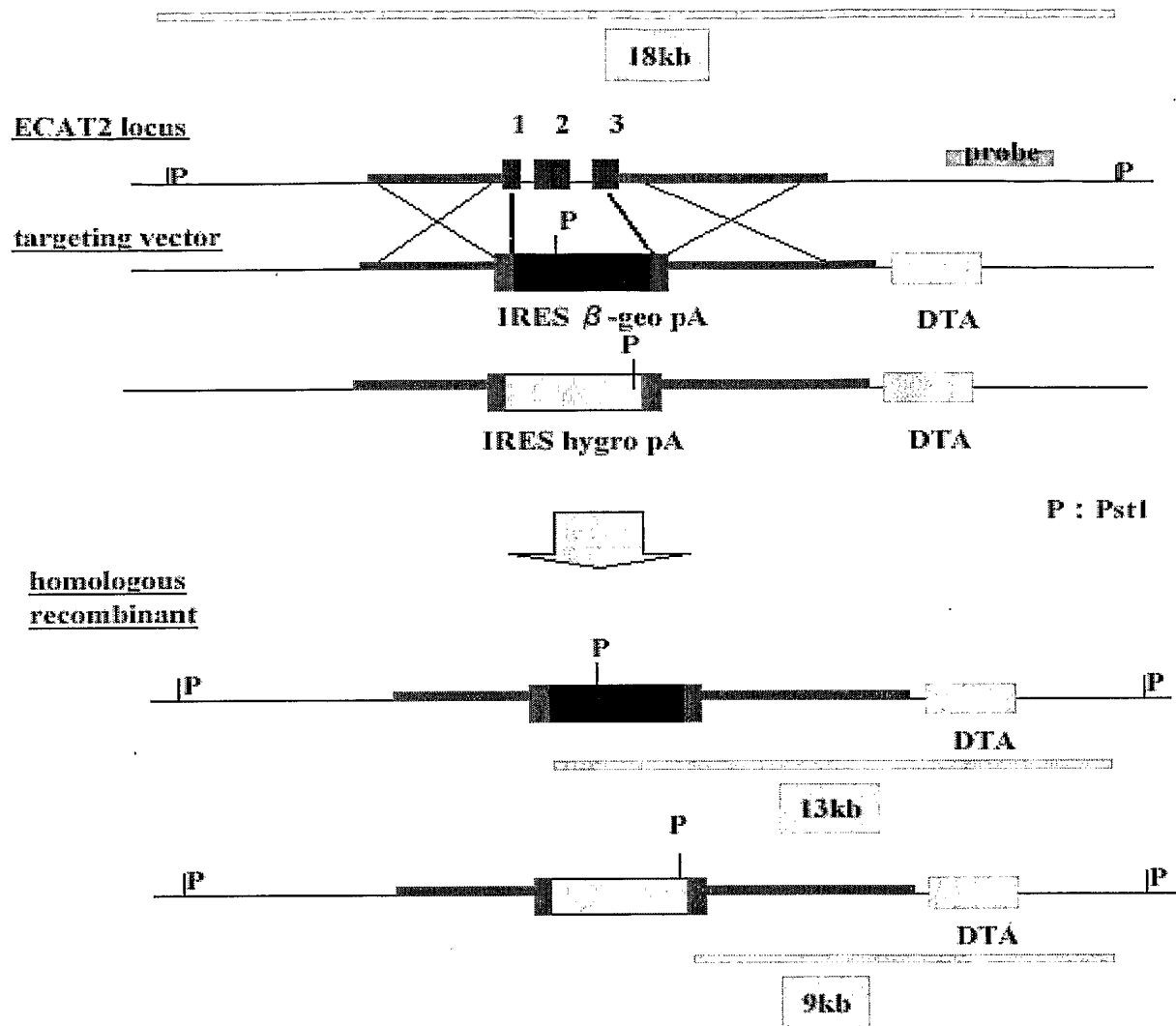
NAT1

positive control



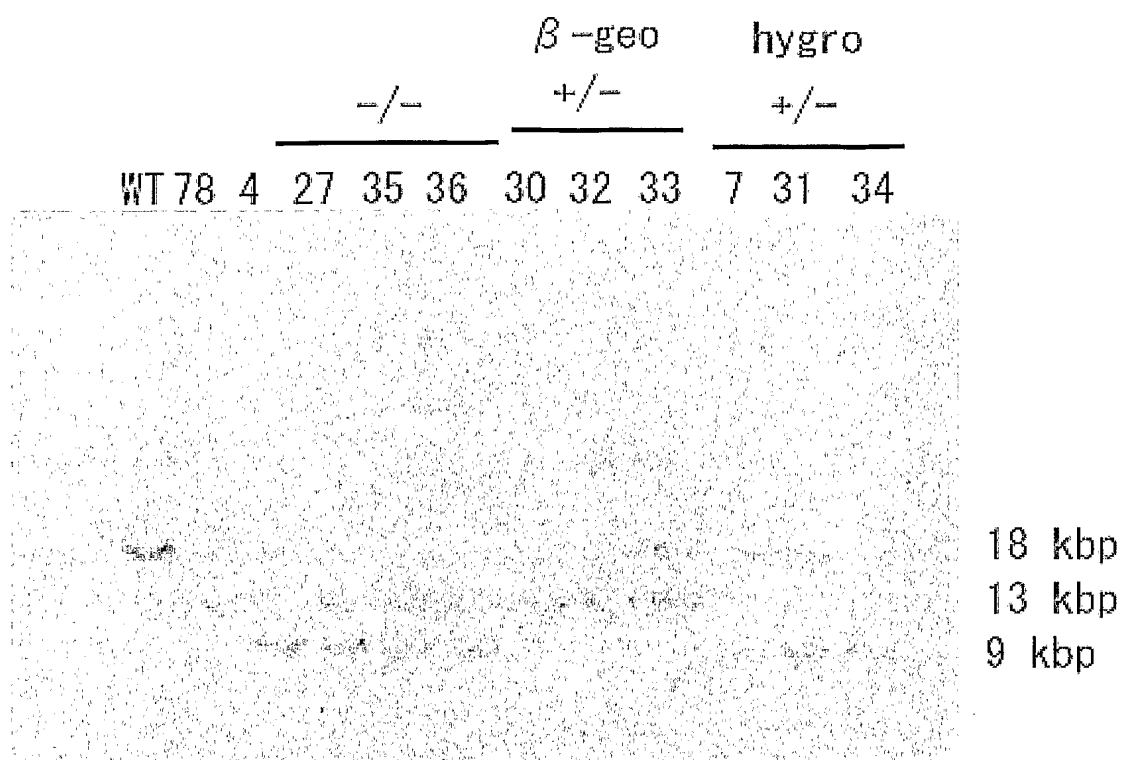
3/8

図 4



4/8

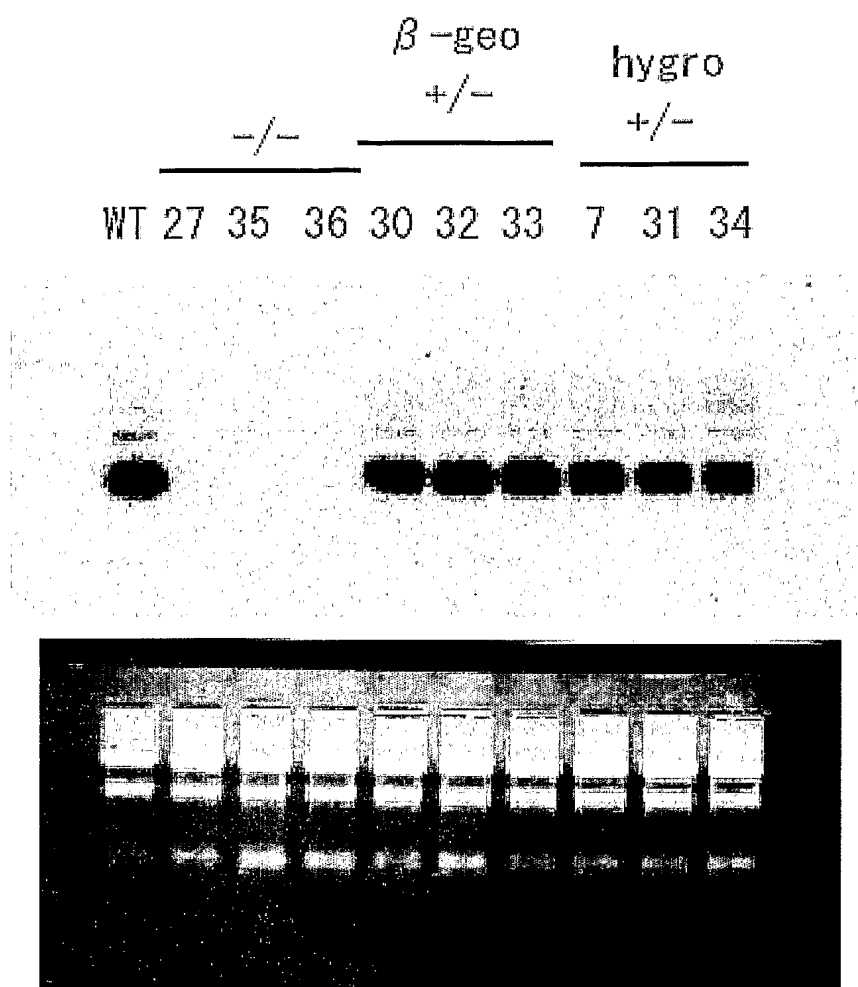
図 5





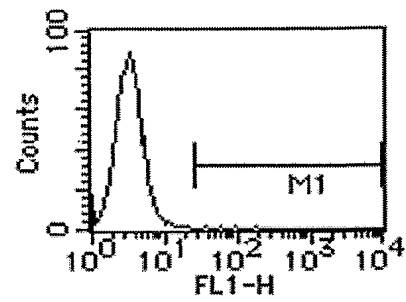
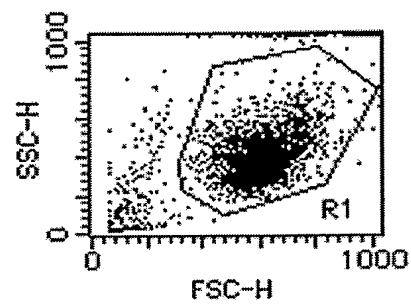
5/8

図 6

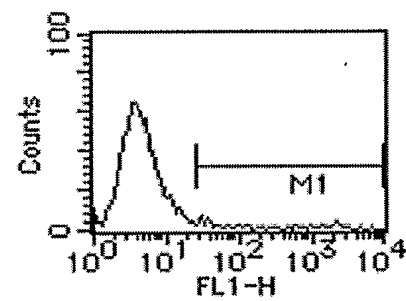
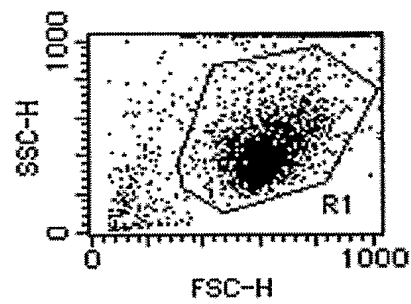


6/8

図 7

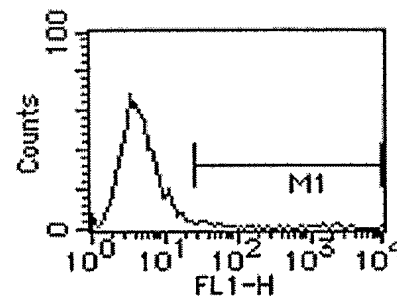
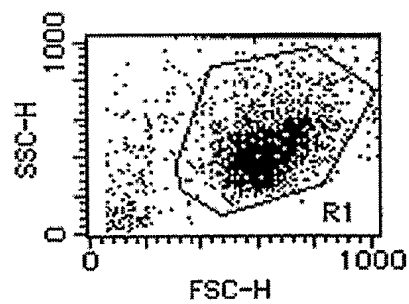
**RF8**

Events	% Gated
7267	100.00
4	0.06

**RF8/T<sup>CAG-EGFP</sup>**

300 V(DC)

Events	% Gated
6769	100.00
189	2.79

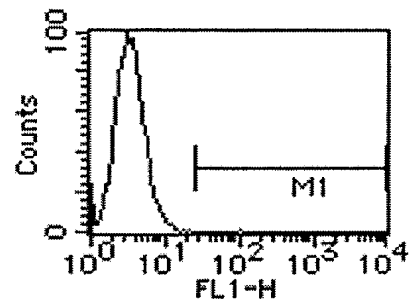
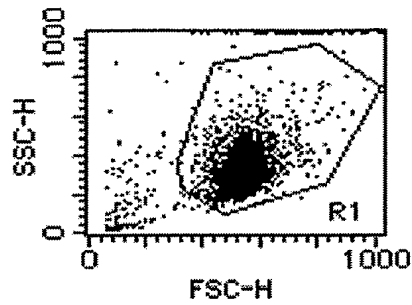


500 V(DC)

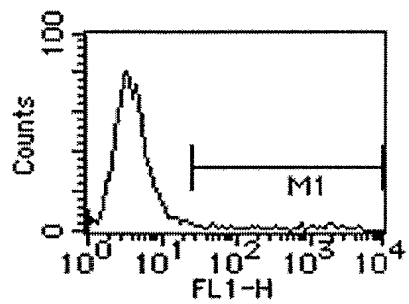
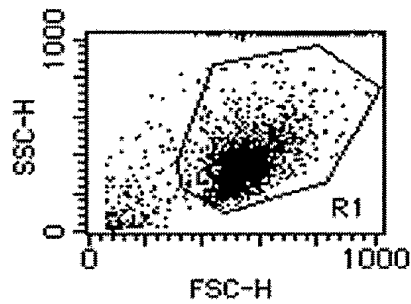
Events	% Gated
6819	100.00
143	2.10

7/8

8

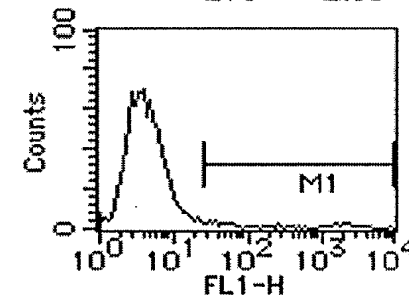
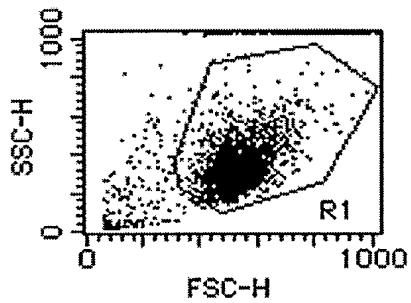
**NAT1<sup>-/-</sup>(neo/Cre)**

Events	% Gated
8749	100.00
1	0.01

**NAT1<sup>-/-</sup>(neo/Cre)/T<sup>CAG-EGFP</sup>**

300 V(DC)

Events	% Gated
7880	100.00
210	2.66

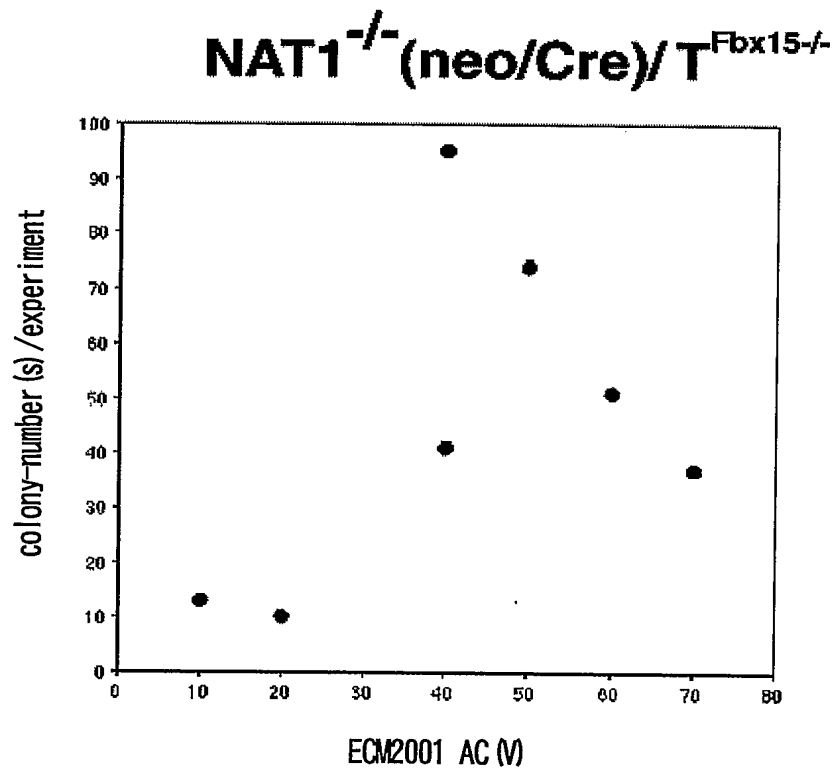
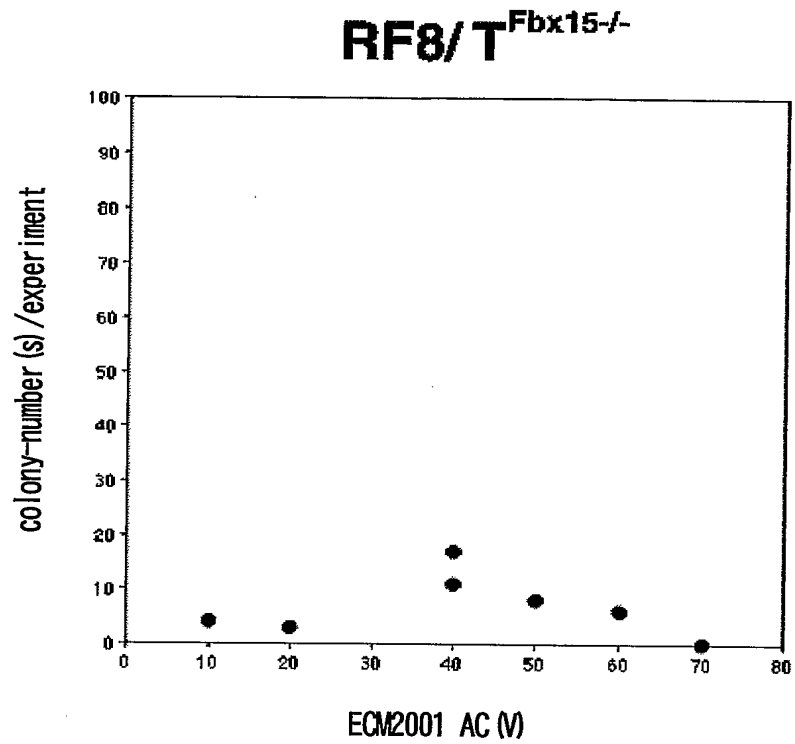


500 V(DC)

Events	% Gated
7877	100.00
147	1.87

8/8

図 9



## SEQUENCE LISTING

<110> Yamanaka, Shinya  
Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

<120> Screening method for substances which induce  
nuclear reprogramming of somatic cells

<130> 533786

<150> JP 2004-042337  
<151> 2004-02-19

<150> JP 2004-232961  
<151> 2004-08-10

<150> JP 2004-276572  
<151> 2004-09-24

<160> 50

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 1623  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (50)..(1369)

<400> 1  
tgactgatct tgagtttgca taggcttcct gcggtgaaac gggtagact atg gcc tct 58  
Met Ala Ser  
1

ctg aag agg ttt cag acg ctc gtg ccc ctg gat cac aaa caa ggt acc 106  
Leu Lys Arg Phe Gln Thr Leu Val Pro Leu Asp His Lys Gln Gly Thr  
5 10 15

tta ttt gaa att att gga gag ccc aag ttg ccc aag tgg ttc cat gtc 154  
Leu Phe Glu Ile Ile Gly Glu Pro Lys Leu Pro Lys Trp Phe His Val

2/84

20	25	30	35	
gaa tgc ctg gaa gat cca aaa aga ctg tac gtg gaa cct cgg cta ctg				202
Glu Cys Leu Glu Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Val Glu Pro Arg Leu Leu				
	40	45	50	
gaa atc atg ttt ggt aag gat gga gag cac atc cca cat ctt gaa tct				250
Glu Ile Met Phe Gly Lys Asp Gly Glu His Ile Pro His Leu Glu Ser				
	55	60	65	
atg ttg cac acc ctg ata cat gtg aac gtg tgg ggc cct gaa agg cga				298
Met Leu His Thr Leu Ile His Val Asn Val Trp Gly Pro Glu Arg Arg				
	70	75	80	
gct gag att tgg ata ttc gga ccg ccg cct ttc cga agg gac gtt gac				346
Ala Glu Ile Trp Ile Phe Gly Pro Pro Pro Phe Arg Arg Asp Val Asp				
	85	90	95	
cgg atg ctc act gat ctg gct cac tat tgc cgc atg aaa ctg atg gaa				394
Arg Met Leu Thr Asp Leu Ala His Tyr Cys Arg Met Lys Leu Met Glu				
100	105	110	115	
ata gag gct ctg gag gct gga gtt gag cgt cgt cgt atg gcg gcc cat				442
Ile Glu Ala Leu Glu Ala Gly Val Glu Arg Arg Arg Met Ala Ala His				
	120	125	130	
aag gct gcc acc cag cct gct ccc gtg aag gtc cgc gag gct gcc cct				490
Lys Ala Ala Thr Gln Pro Ala Pro Val Lys Val Arg Glu Ala Ala Pro				
	135	140	145	
cgg ccc gct tcc gtg aag gtc cct gag acg gcc acc cag cct gct ccc				538
Arg Pro Ala Ser Val Lys Val Pro Glu Thr Ala Thr Gln Pro Ala Pro				
	150	155	160	
gtg aag gtc cgc gag gct gcc cct cag ccc gct ccg gtg cag gag gtc				586
Val Lys Val Arg Glu Ala Ala Pro Gln Pro Ala Pro Val Gln Glu Val				
	165	170	175	
cgc gag gct gcc cct cag cag gct tcc gtg cag gag gag gtc cgc gag				634
Arg Glu Ala Ala Pro Gln Gln Ala Ser Val Gln Glu Glu Val Arg Glu				
180	185	190	195	
gct gcc acc gag cag gct ccc gtg cag gag gtc cgc gag gct gcc acc				682

3/84

Ala	Ala	Thr	Glu	Gln	Ala	Pro	Val	Gln	Glu	Val	Arg	Glu	Ala	Ala	Thr		
				200					205					210			
gag	cag	gct	ccc	gtg	cag	gag	gtc	agc	gag	gct	gcc	acc	gag	cag	gct	730	
Glu	Gln	Ala	Pro	Val	Gln	Glu	Val	Ser	Glu	Ala	Ala	Thr	Glu	Gln	Ala		
			215					220					225				
ccc	gtg	cag	gag	gtc	aac	gag	gct	gcc	acc	gag	cag	gct	tcc	gtg	cag	778	
Pro	Val	Gln	Glu	Val	Asn	Glu	Ala	Ala	Thr	Glu	Gln	Ala	Ser	Val	Gln		
		230					235					240					
gcg	gtc	cgc	gag	gct	gcc	acc	cgg	cgc	gct	ccc	ggg	aag	gtc	cgc	aag	826	
Ala	Val	Arg	Glu	Ala	Ala	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Lys	Val	Arg	Lys		
	245					250					255						
gcg	gcc	acc	cag	ccg	gct	ccg	gtg	cag	gtt	tgc	cag	gag	gcc	acc	cag	874	
Ala	Ala	Thr	Gln	Pro	Ala	Pro	Val	Gln	Val	Cys	Gln	Glu	Ala	Thr	Gln		
260					265				270					275			
ttg	gct	ccc	gtg	aag	gtc	cgc	gag	gcg	gcc	acc	cag	ccg	gct	tcc	ggg	922	
Leu	Ala	Pro	Val	Lys	Val	Arg	Glu	Ala	Ala	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Gly		
			280						285				290				
aag	gtc	cgc	gag	gcg	gcc	acc	cag	ttg	gct	cct	gtg	aag	gtc	cgc	aag	970	
Lys	Val	Arg	Glu	Ala	Ala	Thr	Gln	Leu	Ala	Pro	Val	Lys	Val	Arg	Lys		
		295						300				305					
gca	gcc	acc	cag	ttg	gct	cct	gtg	aag	gtc	cac	gag	gcg	gcc	acc	cag	1018	
Ala	Ala	Thr	Gln	Leu	Ala	Pro	Val	Lys	Val	His	Glu	Ala	Ala	Thr	Gln		
		310					315					320					
ccg	gct	ccg	ggg	aag	gtc	agc	gat	gct	gcc	acg	cag	tcg	gct	tcg	gtg	1066	
Pro	Ala	Pro	Gly	Lys	Val	Ser	Asp	Ala	Ala	Thr	Gln	Ser	Ala	Ser	Val		
	325					330					335						
cag	gtt	cgt	gag	gct	gcc	acg	cag	ctg	tct	ccc	gtg	gag	gcc	act	gat	1114	
Gln	Val	Arg	Glu	Ala	Ala	Thr	Gln	Leu	Ser	Pro	Val	Glu	Ala	Thr	Asp		
340					345				350					355			
act	agc	cag	ttg	gct	cag	gtg	aag	gct	gat	gaa	gcc	ttt	gcc	cag	cac	1162	
Thr	Ser	Gln	Leu	Ala	Gln	Val	Lys	Ala	Asp	Glu	Ala	Phe	Ala	Gln	His		
			360					365					370				

4/84

act tca ggg gag gcc cac cag gtt gcc aat ggg cag tct ccc att gaa 1210  
 Thr Ser Gly Glu Ala His Gln Val Ala Asn Gly Gln Ser Pro Ile Glu  
 375 380 385

gtc tgt gag act gcc acc ggg cag cat tct cta gat gtc tct agg gcc 1258  
 Val Cys Glu Thr Ala Thr Gly Gln His Ser Leu Asp Val Ser Arg Ala  
 390 395 400

ttg tcc cag aag tgt cct gag gtt ttt gag tgg gag acc cag agt tgt 1306  
 Leu Ser Gln Lys Cys Pro Glu Val Phe Glu Trp Glu Thr Gln Ser Cys  
 405 410 415

ttg gat ggc agc tat gtc ata gtt cag cct cca agg gat gcc tgg gaa 1354  
 Leu Asp Gly Ser Tyr Val Ile Val Gln Pro Pro Arg Asp Ala Trp Glu  
 420 425 430 435

tca ttt atc ata tta taaatgcac tctggtgtga gccaggatag atggtacacg 1409  
 Ser Phe Ile Ile Leu  
 440

tctgcaaacc cagaacctaa aggcaggggt tagcttgggc tgagtaaggc aatgatctta 1469

aacctcagcc tgccctaagac tcccttcac tttctttctg gtttttgccc taggaatcgg 1529

gaagaacaga gtagagctgt ttttgtttcc ccattgtgtt aaatgtttgc agacacaatt 1589

taaagtattc taataaaaaa aaaattgcat tccc 1623

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 440

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 2

Met Ala Ser Leu Lys Arg Phe Gln Thr Leu Val Pro Leu Asp His Lys  
 1 5 10 15

Gln Gly Thr Leu Phe Glu Ile Ile Gly Glu Pro Lys Leu Pro Lys Trp  
 20 25 30

Phe His Val Glu Cys Leu Glu Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Val Glu Pro  
 35 40 45



5/84

Arg	Leu	Leu	Glu	Ile	Met	Phe	Gly	Lys	Asp	Gly	Glu	His	Ile	Pro	His	50	55	60
Leu	Glu	Ser	Met	Leu	His	Thr	Leu	Ile	His	Val	Asn	Val	Trp	Gly	Pro	65	70	75
Glu	Arg	Arg	Ala	Glu	Ile	Trp	Ile	Phe	Gly	Pro	Pro	Pro	Phe	Arg	Arg	85	90	95
Asp	Val	Asp	Arg	Met	Leu	Thr	Asp	Leu	Ala	His	Tyr	Cys	Arg	Met	Lys	100	105	110
Leu	Met	Glu	Ile	Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Gly	Val	Glu	Arg	Arg	Arg	Met	115	120	125
Ala	Ala	His	Lys	Ala	Ala	Thr	Gln	Pro	Ala	Pro	Val	Lys	Val	Arg	Glu	130	135	140
Ala	Ala	Pro	Arg	Pro	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Pro	Glu	Thr	Ala	Thr	Gln	145	150	155
Pro	Ala	Pro	Val	Lys	Val	Arg	Glu	Ala	Ala	Pro	Gln	Pro	Ala	Pro	Val	165	170	175
Gln	Glu	Val	Arg	Glu	Ala	Ala	Pro	Gln	Gln	Ala	Ser	Val	Gln	Glu	Glu	180	185	190
Val	Arg	Glu	Ala	Ala	Thr	Glu	Gln	Ala	Pro	Val	Gln	Glu	Val	Arg	Glu	195	200	205
Ala	Ala	Thr	Glu	Gln	Ala	Pro	Val	Gln	Glu	Val	Ser	Glu	Ala	Ala	Thr	210	215	220
Glu	Gln	Ala	Pro	Val	Gln	Glu	Val	Asn	Glu	Ala	Ala	Thr	Glu	Gln	Ala	225	230	235
Ser	Val	Gln	Ala	Val	Arg	Glu	Ala	Ala	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Lys	245	250	255
Val	Arg	Lys	Ala	Ala	Thr	Gln	Pro	Ala	Pro	Val	Gln	Val	Cys	Gln	Glu	260	265	270

6/84

Ala Thr Gln Leu Ala Pro Val Lys Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Pro  
 275 280 285

Ala Ser Gly Lys Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Leu Ala Pro Val Lys  
 290 295 300

Val Arg Lys Ala Ala Thr Gln Leu Ala Pro Val Lys Val His Glu Ala  
 305 310 315 320

Ala Thr Gln Pro Ala Pro Gly Lys Val Ser Asp Ala Ala Thr Gln Ser  
 325 330 335

Ala Ser Val Gln Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Leu Ser Pro Val Glu  
 340 345 350

Ala Thr Asp Thr Ser Gln Leu Ala Gln Val Lys Ala Asp Glu Ala Phe  
 355 360 365

Ala Gln His Thr Ser Gly Glu Ala His Gln Val Ala Asn Gly Gln Ser  
 370 375 380

Pro Ile Glu Val Cys Glu Thr Ala Thr Gly Gln His Ser Leu Asp Val  
 385 390 395 400

Ser Arg Ala Leu Ser Gln Lys Cys Pro Glu Val Phe Glu Trp Glu Thr  
 405 410 415

Gln Ser Cys Leu Asp Gly Ser Tyr Val Ile Val Gln Pro Pro Arg Asp  
 420 425 430

Ala Trp Glu Ser Phe Ile Ile Leu  
 435 440

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1063

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (54).. (704)

&lt;400&gt; 3

tcggcctttg ggtttgctgt ggtgtccttg tctcctgcag gaccggccgc agc atg	56
Met	
1	
 gac gct ccc agg cgg ttt ccg acg ctc gtg caa ctg atg cag cca aaa	104
Asp Ala Pro Arg Arg Phe Pro Thr Leu Val Gln Leu Met Gln Pro Lys	
5 10 15	
 gca atg cca gtg gag gtg ctc ggt cac ctc cct aag cgg ttc tcc tgg	152
Ala Met Pro Val Glu Val Leu Gly His Leu Pro Lys Arg Phe Ser Trp	
20 25 30	
 ttc cac tct gag ttc ctg aag aat ccg aag gta gtt cgc ctt gag gtt	200
Phe His Ser Glu Phe Leu Lys Asn Pro Lys Val Val Arg Leu Glu Val	
35 40 45	
 tgg ctg gtg gaa aag atc ttc ggc cgg ggc gga gaa cgc atc ccg cac	248
Trp Leu Val Glu Lys Ile Phe Gly Arg Gly Gly Glu Arg Ile Pro His	
50 55 60 65	
 gtc cag ggt atg tcc caa atc ttg att cac gtg aat cga ttg gac cct	296
Val Gln Gly Met Ser Gln Ile Leu Ile His Val Asn Arg Leu Asp Pro	
70 75 80	
 aac ggc gag gct gag atc ttg gta ttt ggg agg cct tct tac cag gag	344
Asn Gly Glu Ala Glu Ile Leu Val Phe Gly Arg Pro Ser Tyr Gln Glu	
85 90 95	
 gac aca atc aag atg atc atg aac ctg gct gac tat cac cgc cag ctc	392
Asp Thr Ile Lys Met Ile Met Asn Leu Ala Asp Tyr His Arg Gln Leu	
100 105 110	
 cag gcg aaa ggc tca gga aag gcc ctc gcc cag gat gtc gcc act cag	440
Gln Ala Lys Gly Ser Gly Lys Ala Leu Ala Gln Asp Val Ala Thr Gln	
115 120 125	
 aag gcc gag acc cag cgg tct tca ata gaa gtc cgg gag gcc ggg acg	488
Lys Ala Glu Thr Gln Arg Ser Ser Ile Glu Val Arg Glu Ala Gly Thr	
130 135 140 145	
 cag cgt tcg gtg gag gtc cgg gag gcc ggg acc cag cgt tcg gtg gaa	536

8/84

Gln Arg Ser Val Glu Val Arg Glu Ala Gly Thr Gln Arg Ser Val Glu  
 150 155 160

gtc cag gag gtc ggg aca cag ggt tct ccg gtg gag gtg cag gag gcc 584  
 Val Gln Glu Val Gly Thr Gln Gly Ser Pro Val Glu Val Gln Glu Ala  
 165 170 175

ggg acc cag cag tct ctc cag gct gcc aac aag tcg ggg acc cag cga 632  
 Gly Thr Gln Gln Ser Leu Gln Ala Ala Asn Lys Ser Gly Thr Gln Arg  
 180 185 190

tcc ccc gaa gct gcc agc aag gca gtg acc cag cgg ttt cgc gag gat 680  
 Ser Pro Glu Ala Ala Ser Lys Ala Val Thr Gln Arg Phe Arg Glu Asp  
 195 200 205

gcc cgg gac cca gtt act aga tta tgaaggcattc tcaggccctg gagccagagc 734  
 Ala Arg Asp Pro Val Thr Arg Leu  
 210 215

cagtcagggg ttaaagtgaag agcccgtatt tccgccccaga agctgggggtt ggggagagga 794

tgtggattttt ttgtttttacc ctttctgttg catgggttgca aacacaaact tgagttctaa 854

taaagaattg caaagtggaa gcccgcctccc cccctccccc ccgcctccct taagtccagg 914

aagctgggggt ggcgaggaag gatgatgtgg attgttttttg ttttaccct tttgttgaat 974

ggttgccaac ccaaacttga gttttaataa ataattgcct ttccaaaaaa aaaaaaaaaa 1034

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1063

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 217

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Met Asp Ala Pro Arg Arg Phe Pro Thr Leu Val Gln Leu Met Gln Pro  
 1 5 10 15

Lys Ala Met Pro Val Glu Val Leu Gly His Leu Pro Lys Arg Phe Ser  
 20 25 30

9/84

Trp Phe His Ser Glu Phe Leu Lys Asn Pro Lys Val Val Arg Leu Glu  
           35                          40                          45

Val Trp Leu Val Glu Lys Ile Phe Gly Arg Gly Gly Glu Arg Ile Pro  
           50                          55                          60

His Val Gln Gly Met Ser Gln Ile Leu Ile His Val Asn Arg Leu Asp  
       65                          70                          75                          80

Pro Asn Gly Glu Ala Glu Ile Leu Val Phe Gly Arg Pro Ser Tyr Gln  
                           85                          90                          95

Glu Asp Thr Ile Lys Met Ile Met Asn Leu Ala Asp Tyr His Arg Gln  
                   100                          105                          110

Leu Gln Ala Lys Gly Ser Gly Lys Ala Leu Ala Gln Asp Val Ala Thr  
           115                          120                          125

Gln Lys Ala Glu Thr Gln Arg Ser Ser Ile Glu Val Arg Glu Ala Gly  
       130                          135                          140

Thr Gln Arg Ser Val Glu Val Arg Glu Ala Gly Thr Gln Arg Ser Val  
       145                          150                          155                          160

Glu Val Gln Glu Val Gly Thr Gln Gly Ser Pro Val Glu Val Gln Glu  
                           165                          170                          175

Ala Gly Thr Gln Gln Ser Leu Gln Ala Ala Asn Lys Ser Gly Thr Gln  
                   180                          185                          190

Arg Ser Pro Glu Ala Ala Ser Lys Ala Val Thr Gln Arg Phe Arg Glu  
           195                          200                          205

Asp Ala Arg Asp Pro Val Thr Arg Leu  
       210                          215

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 591

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

10/84

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (59).. (412)

&lt;400&gt; 5

gccgtgCGTg gtggataagc ttgatctcgt cttccctgaa gtctgggttcc ttggcagg 58

atg atg gtg acc ctc gtg acc cgt aaa gat atc ccc ccg tgg gtg aaa 106

Met Met Val Thr Leu Val Thr Arg Lys Asp Ile Pro Pro Trp Val Lys

1

5

10

15

gtt cct gaa gac ctg aaa gat cca gaa gta ttc cag gtc cag tcg ctg 154

Val Pro Glu Asp Leu Lys Asp Pro Glu Val Phe Gln Val Gln Ser Leu

20

25

30

gtg ctg aaa tat ctg ttt ggc cca cag gga tct cga atg tct cac atc 202

Val Leu Lys Tyr Leu Phe Gly Pro Gln Gly Ser Arg Met Ser His Ile

35

40

45

gag cag gtg agc cag gcc atg ttt gag ctg aag aac ctg gaa tct ccc 250

Glu Gln Val Ser Gln Ala Met Phe Glu Leu Lys Asn Leu Glu Ser Pro

50

55

60

gaa gaa ctt atc gag gtc ttc att tac ggc tct caa aac aac aag att 298

Glu Glu Leu Ile Glu Val Phe Ile Tyr Gly Ser Gln Asn Asn Lys Ile

65

70

75

80

cgg gct aaa tgg atg ctt cag tcc atg gct gag agg tac cac ctg cgc 346

Arg Ala Lys Trp Met Leu Gln Ser Met Ala Glu Arg Tyr His Leu Arg

85

90

95

cag caa aaa gga gtg ctg aag ctg gag gaa tcc atg aag acc ctg gag 394

Gln Gln Lys Gly Val Leu Lys Leu Glu Glu Ser Met Lys Thr Leu Glu

100

105

110

cta ggc cag tgt atc gag tgaagccagt ttccagtcct tgtgtctccg 442

Leu Gly Gln Cys Ile Glu

115

acctggatgc aggttaagct gtggccagtg tttgggttctg gcgggatttt tagctttgtt 502

acatcctagc aagatattct ggatccctgc tgcgcattct gatgtgaatc ccaagggttac 562

11/84

cactctaaat aaaaaataaa attgaagtg

591

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 6

Met Met Val Thr Leu Val Thr Arg Lys Asp Ile Pro Pro Trp Val Lys  
1 5 10 15

Val Pro Glu Asp Leu Lys Asp Pro Glu Val Phe Gln Val Gln Ser Leu  
20 25 30

Val Leu Lys Tyr Leu Phe Gly Pro Gln Gly Ser Arg Met Ser His Ile  
35 40 45

Glu Gln Val Ser Gln Ala Met Phe Glu Leu Lys Asn Leu Glu Ser Pro  
50 55 60

Glu Glu Leu Ile Glu Val Phe Ile Tyr Gly Ser Gln Asn Asn Lys Ile  
65 70 75 80

Arg Ala Lys Trp Met Leu Gln Ser Met Ala Glu Arg Tyr His Leu Arg  
85 90 95

Gln Gln Lys Gly Val Leu Lys Leu Glu Glu Ser Met Lys Thr Leu Glu  
100 105 110

Leu Gly Gln Cys Ile Glu  
115

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 640

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

12/84

&lt;222&gt; (15).. (362)

&lt;400&gt; 7

ggcacgagga taag atg gga act ctc ccg gca cgt aga cat atc ccg ccg 50  
 Met Gly Thr Leu Pro Ala Arg Arg His Ile Pro Pro  
 1 5 10

tgg gtg aaa gtt ccc gaa gac ctg aaa gat cca gag gtg ttc cag gtc 98  
 Trp Val Lys Val Pro Glu Asp Leu Lys Asp Pro Glu Val Phe Gln Val  
 15 20 25

cag acg cgg ctg ctg aaa gcc att ttc ggc ccg gac gga tct cga atc 146  
 Gln Thr Arg Leu Leu Lys Ala Ile Phe Gly Pro Asp Gly Ser Arg Ile  
 30 35 40

cct tac atc gag cag gtg agc aag gcc atg ctc gag ctg aag gct ctg 194  
 Pro Tyr Ile Glu Gln Val Ser Lys Ala Met Leu Glu Leu Lys Ala Leu  
 45 50 55 60

gag tct tca gac ctc acc gag gtc gtg gtt tac ggc tcc tat ttg tac 242  
 Glu Ser Ser Asp Leu Thr Glu Val Val Val Tyr Gly Ser Tyr Leu Tyr  
 65 70 75

aag ctc cgg acc aag tgg atg ctc cag tcc atg gct gag tgg cac cgc 290  
 Lys Leu Arg Thr Lys Trp Met Leu Gln Ser Met Ala Glu Trp His Arg  
 80 85 90

cag cgc cag gag cga ggg atg ctc aaa ctt gcc gaa gcc atg aat gcc 338  
 Gln Arg Gln Glu Arg Gly Met Leu Lys Leu Ala Glu Ala Met Asn Ala  
 95 100 105

ctc gaa cta ggc cct tgg atg aag tgaaccagtt tccagccaat gcaatgaagc 392  
 Leu Glu Leu Gly Pro Trp Met Lys  
 110 115

cgggttgacag agattagggtt gtggccagag ctagagtgat tccttaagct tgttttaaaa 452

tctgctccag cctaaagagt taagggaata ccatttggtc ccttaaagag ttaagggaata 512

acccttggtc ctgagtcctg ttgtgaatat ttctttgatg attgttaata aaaagtgttt 572

tttctttttt cccattttta aaaataacaa taaagtttta aataagttga taaaaaaaaa 632



13/84

aaaaaaaa

640

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

Met Gly Thr Leu Pro Ala Arg Arg His Ile Pro Pro Trp Val Lys Val

1

5

10

15

Pro Glu Asp Leu Lys Asp Pro Glu Val Phe Gln Val Gln Thr Arg Leu

20

25

30

Leu Lys Ala Ile Phe Gly Pro Asp Gly Ser Arg Ile Pro Tyr Ile Glu

35

40

45

Gln Val Ser Lys Ala Met Leu Glu Leu Lys Ala Leu Glu Ser Ser Asp

50

55

60

Leu Thr Glu Val Val Val Tyr Gly Ser Tyr Leu Tyr Lys Leu Arg Thr

65

70

75

80

Lys Trp Met Leu Gln Ser Met Ala Glu Trp His Arg Gln Arg Gln Glu

85

90

95

Arg Gly Met Leu Lys Leu Ala Glu Ala Met Asn Ala Leu Glu Leu Gly

100

105

110

Pro Trp Met Lys

115

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1670

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (134).. (1567)

&lt;400&gt; 9

acttgccctgt ccaagatctg ttggaatctg cttctacaga agaccagctg aaacaaatag 60

cttcgtggga ctgagcacia ctactagatt cttggacttc cgttcacagc tgccaattgt 120

tgggagtaca ata atg gag gag tcg gaa ttg gag att ttt aga agt aag 169

Met Glu Glu Ser Glu Leu Glu Ile Phe Arg Ser Lys

1

5

10

ttt gtt aga ggc tca tct gtc acg aag cag cat gcc tgg cga aac cag 217

Phe Val Arg Gly Ser Ser Val Thr Lys Gln His Ala Trp Arg Asn Gln

15

20

25

cac agc gag aag cgt tgc tct tcc tcc atc agt tct ata tcc ctg gac 265

His Ser Glu Lys Arg Cys Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ile Ser Leu Asp

30

35

40

aga atg cca tcg gaa atc ttg gtg aag ata ctt tct tac ttg gat gcg 313

Arg Met Pro Ser Glu Ile Leu Val Lys Ile Leu Ser Tyr Leu Asp Ala

45

50

55

60

gtg acc ttg gtg tgc att gga tgt gtg agc aga cgc ttt tat cat ttg 361

Val Thr Leu Val Cys Ile Gly Cys Val Ser Arg Arg Phe Tyr His Leu

65

70

75

gct gat gac aat ctt att tgg gtc agg aag tac gca gct gca ttt aga 409

Ala Asp Asp Asn Leu Ile Trp Val Arg Lys Tyr Ala Ala Ala Phe Arg

80

85

90

tca aaa aga tca cgt tgg aaa gct act tca gtg gag gaa aca gcc aca 457

Ser Lys Arg Ser Arg Trp Lys Ala Thr Ser Val Glu Glu Thr Ala Thr

95

100

105

agt ctg agc ttg ctg tca gtt tgg gat aaa gaa gat gga tac tgg aag 505

Ser Leu Ser Leu Leu Ser Val Trp Asp Lys Glu Asp Gly Tyr Trp Lys

110

115

120

aaa gaa tat att aca aag cag atc tca tct gtg aga gca gcc ctc acc 553

Lys Glu Tyr Ile Thr Lys Gln Ile Ser Ser Val Arg Ala Ala Leu Thr

125

130

135

140

aac agc ctc agt cct gtc aaa cgc cgc aca agc ctt cct tcg aaa acc 601

15/84

Asn Ser Leu Ser Pro Val Lys Arg Arg Thr Ser Leu Pro Ser Lys Thr	
145	150 155
aaa gag tcc ctc aga ata tct ggc tta ggt tgg aca atc atc tta aga	649
Lys Glu Ser Leu Arg Ile Ser Gly Leu Gly Trp Thr Ile Ile Leu Arg	
160	165 170
gaa gcc agt ggc aaa gaa cac atc atg cag cat tcg aat ctt tcc gta	697
Glu Ala Ser Gly Lys Glu His Ile Met Gln His Ser Asn Leu Ser Val	
175	180 185
aat gac aac tct gtc act gtt ttt tgg cat gac aaa aat tgg cca cat	745
Asn Asp Asn Ser Val Thr Val Phe Trp His Asp Lys Asn Trp Pro His	
190	195 200
gta gac acg ttg tcc acc ctg gat ttg tat ggt gcc aca cca att ttt	793
Val Asp Thr Leu Ser Thr Leu Asp Leu Tyr Gly Ala Thr Pro Ile Phe	
205	210 215 220
atg gag cag tat aaa ggc cct aac aca agt tgt cca cga tgg ctg tct	841
Met Glu Gln Tyr Lys Gly Pro Asn Thr Ser Cys Pro Arg Trp Leu Ser	
225	230 235
tta att gaa aag tac gat ctg agt aat tta cgc aag tct gct atg att	889
Leu Ile Glu Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Arg Lys Ser Ala Met Ile	
240	245 250
ggc tgc gac aga cat gtt cgg gta ttc tgt gta aat cct ggc ctc ctg	937
Gly Cys Asp Arg His Val Arg Val Phe Cys Val Asn Pro Gly Leu Leu	
255	260 265
gtg ggg ctg tgg cag gag aat ggt gga cta gct ttt gtc atg gca aat	985
Val Gly Leu Trp Gln Glu Asn Gly Gly Leu Ala Phe Val Met Ala Asn	
270	275 280
att cat tcc cat ggc ctt ttc gag aga agc ata atg ggc tca gac act	1033
Ile His Ser His Gly Leu Phe Glu Arg Ser Ile Met Gly Ser Asp Thr	
285	290 295 300
att ccc tat aca ttg cct ccc gac act aca ttt gtg gat aac tac cca	1081
Ile Pro Tyr Thr Leu Pro Pro Asp Thr Thr Phe Val Asp Asn Tyr Pro	
305	310 315

16/84

gac tca atg acc ttt tat gga gat aaa ggc ttt cag ctg cat atc gac	1129
Asp Ser Met Thr Phe Tyr Gly Asp Lys Gly Phe Gln Leu His Ile Asp	
320 325 330	
att cat ggc agt aag act tac ttc ctg tgt agc acc ttc cac aat ctc	1177
Ile His Gly Ser Lys Thr Tyr Phe Leu Cys Ser Thr Phe His Asn Leu	
335 340 345	
ttc tgc agg aga gcg ggc att aac aat gga tat gtg aag ttc ttg atg	1225
Phe Cys Arg Arg Ala Gly Ile Asn Asn Gly Tyr Val Lys Phe Leu Met	
350 355 360	
ata aac tta aaa aat aac aga gaa cac cta cct ctt gtt gga aaa gtt	1273
Ile Asn Leu Lys Asn Asn Arg Glu His Leu Pro Leu Val Gly Lys Val	
365 370 375 380	
ggc ctt gaa tgg aga act gac tgt tta aat ggc cgt att gag agt tgc	1321
Gly Leu Glu Trp Arg Thr Asp Cys Leu Asn Gly Arg Ile Glu Ser Cys	
385 390 395	
att gta gtg gat atg acc ttg ctg gat gag gac aag aag ccc atc tgg	1369
Ile Val Val Asp Met Thr Leu Leu Asp Glu Asp Lys Lys Pro Ile Trp	
400 405 410	
tat gtg agt tct cca gtg tgc ttg aga tct gcc tgc ctt cct gat ttc	1417
Tyr Val Ser Ser Pro Val Cys Leu Arg Ser Ala Cys Leu Pro Asp Phe	
415 420 425	
ccg cag ccg gct tac tct ttc gag tac atg gac agc gta gga gga gtg	1465
Pro Gln Pro Ala Tyr Ser Phe Glu Tyr Met Asp Ser Val Gly Gly Val	
430 435 440	
tgc gca gac cta ggg tgg ttt gaa aat acc gat gaa tac ttc att gtc	1513
Cys Ala Asp Leu Gly Trp Phe Glu Asn Thr Asp Glu Tyr Phe Ile Val	
445 450 455 460	
aga ctg gac att tac ctc agt gta gca aaa tta caa caa tgg ttt ggg	1561
Arg Leu Asp Ile Tyr Leu Ser Val Ala Lys Leu Gln Gln Trp Phe Gly	
465 470 475	
agg caa taaatgctga gtttagcagta gggagtccttg ttattagtaa gctgtttgtt	1617
Arg Gln	

17/84

ttttacaact ttgtttttat tgaaagttaa aataaagcat atttgtggta ttc 1670

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 478

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 10

Met Glu Glu Ser Glu Leu Glu Ile Phe Arg Ser Lys Phe Val Arg Gly  
1 5 10 15

Ser Ser Val Thr Lys Gln His Ala Trp Arg Asn Gln His Ser Glu Lys  
20 25 30

Arg Cys Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ile Ser Leu Asp Arg Met Pro Ser  
35 40 45

Glu Ile Leu Val Lys Ile Leu Ser Tyr Leu Asp Ala Val Thr Leu Val  
50 55 60

Cys Ile Gly Cys Val Ser Arg Arg Phe Tyr His Leu Ala Asp Asp Asn  
65 70 75 80

Leu Ile Trp Val Arg Lys Tyr Ala Ala Ala Phe Arg Ser Lys Arg Ser  
85 90 95

Arg Trp Lys Ala Thr Ser Val Glu Glu Thr Ala Thr Ser Leu Ser Leu  
100 105 110

Leu Ser Val Trp Asp Lys Glu Asp Gly Tyr Trp Lys Lys Glu Tyr Ile  
115 120 125

Thr Lys Gln Ile Ser Ser Val Arg Ala Ala Leu Thr Asn Ser Leu Ser  
130 135 140

Pro Val Lys Arg Arg Thr Ser Leu Pro Ser Lys Thr Lys Glu Ser Leu  
145 150 155 160

Arg Ile Ser Gly Leu Gly Trp Thr Ile Ile Leu Arg Glu Ala Ser Gly  
165 170 175

Lys Glu His Ile Met Gln His Ser Asn Leu Ser Val Asn Asp Asn Ser

18/84

180	185	190
Val Thr Val Phe Trp His Asp Lys Asn Trp Pro His Val Asp Thr Leu		
195	200	205
Ser Thr Leu Asp Leu Tyr Gly Ala Thr Pro Ile Phe Met Glu Gln Tyr		
210	215	220
Lys Gly Pro Asn Thr Ser Cys Pro Arg Trp Leu Ser Leu Ile Glu Lys		
225	230	235
Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Arg Lys Ser Ala Met Ile Gly Cys Asp Arg		
245	250	255
His Val Arg Val Phe Cys Val Asn Pro Gly Leu Leu Val Gly Leu Trp		
260	265	270
Gln Glu Asn Gly Gly Leu Ala Phe Val Met Ala Asn Ile His Ser His		
275	280	285
Gly Leu Phe Glu Arg Ser Ile Met Gly Ser Asp Thr Ile Pro Tyr Thr		
290	295	300
Leu Pro Pro Asp Thr Thr Phe Val Asp Asn Tyr Pro Asp Ser Met Thr		
305	310	315
Phe Tyr Gly Asp Lys Gly Phe Gln Leu His Ile Asp Ile His Gly Ser		
325	330	335
Lys Thr Tyr Phe Leu Cys Ser Thr Phe His Asn Leu Phe Cys Arg Arg		
340	345	350
Ala Gly Ile Asn Asn Gly Tyr Val Lys Phe Leu Met Ile Asn Leu Lys		
355	360	365
Asn Asn Arg Glu His Leu Pro Leu Val Gly Lys Val Gly Leu Glu Trp		
370	375	380
Arg Thr Asp Cys Leu Asn Gly Arg Ile Glu Ser Cys Ile Val Val Asp		
385	390	395
Met Thr Leu Leu Asp Glu Asp Lys Lys Pro Ile Trp Tyr Val Ser Ser		
405	410	415

19/84

Pro Val Cys Leu Arg Ser Ala Cys Leu Pro Asp Phe Pro Gln Pro Ala  
 420 425 430

Tyr Ser Phe Glu Tyr Met Asp Ser Val Gly Gly Val Cys Ala Asp Leu  
 435 440 445

Gly Trp Phe Glu Asn Thr Asp Glu Tyr Phe Ile Val Arg Leu Asp Ile  
 450 455 460

Tyr Leu Ser Val Ala Lys Leu Gln Gln Trp Phe Gly Arg Gln  
 465 470 475

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 1665

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (21).. (1550)

&lt;400&gt; 11

agggtgaact ccttgtctct atg gcg act gga cgc ggt cgg atc ttg cag cag 53  
 Met Ala Thr Gly Arg Gly Arg Ile Leu Gln Gln  
 1 5 10

cac tgg ctc ggc ctc cag acg ctg cgc ggg ccc agc agg ggc ggt ggc 101  
 His Trp Leu Gly Leu Gln Thr Leu Arg Gly Pro Ser Arg Gly Gly Gly  
 15 20 25

gcg gcc cgg ggg cgc gcc agg gcc ttt ggg tgc aga aag ggg cca ggg 149  
 Ala Ala Arg Gly Arg Ala Arg Ala Phe Gly Cys Arg Lys Gly Pro Gly  
 30 35 40

gtc aag ctt tct gca ggc tct gct gcc ctg agg tgc cat gcc gga ggt 197  
 Val Lys Leu Ser Ala Gly Ser Ala Ala Leu Arg Cys His Ala Gly Gly  
 45 50 55

gga cag cac tgg gag agc tct ttc tcc tgc tgt tct ggg ttc ctg gat 245  
 Gly Gln His Trp Glu Ser Ser Phe Ser Cys Cys Ser Gly Phe Leu Asp

20/84

60	65	70	75	
gga atg cct tca gaa atc ttg ctg aag ata ttt tcc tac ttg gat gct				293
Gly Met Pro Ser Glu Ile Leu Leu Lys Ile Phe Ser Tyr Leu Asp Ala				
	80	85	90	
gtg agc ctt ctg tgt act gga tgt gtg agc agg cgc ttt tat cat cta				341
Val Ser Leu Leu Cys Thr Gly Cys Val Ser Arg Arg Phe Tyr His Leu				
	95	100	105	
gcc aat gac aat ttt att tgg atc gga atc tac tca act gct ttt tca				389
Ala Asn Asp Asn Phe Ile Trp Ile Gly Ile Tyr Ser Thr Ala Phe Ser				
	110	115	120	
cct gca aga tca aat tgg aaa ttt aat tca gta gag aag ata gct atg				437
Pro Ala Arg Ser Asn Trp Lys Phe Asn Ser Val Glu Lys Ile Ala Met				
	125	130	135	
tct atg agc ttt ctg tca gtt cag gat aaa gaa gct ggt tat tgg aag				485
Ser Met Ser Phe Leu Ser Val Gln Asp Lys Glu Ala Gly Tyr Trp Lys				
	140	145	150	155
aaa gaa tat atc aca aaa caa ata gca tct gta aaa gcc gca cta gct				533
Lys Glu Tyr Ile Thr Lys Gln Ile Ala Ser Val Lys Ala Ala Leu Ala				
	160	165	170	
gac att ctc aaa cct gtc aac cct tac aca ggc ctt cca gtt aag acc				581
Asp Ile Leu Lys Pro Val Asn Pro Tyr Thr Gly Leu Pro Val Lys Thr				
	175	180	185	
aaa gag gcc ctc aga ata ttt ggt tta ggt tgg gca att ata ctg aaa				629
Lys Glu Ala Leu Arg Ile Phe Gly Leu Gly Trp Ala Ile Ile Leu Lys				
	190	195	200	
gaa aaa ggt gga aaa gaa tat atc atg gag cat gtt gat ctt tcc ata				677
Glu Lys Gly Gly Lys Glu Tyr Ile Met Glu His Val Asp Leu Ser Ile				
	205	210	215	
aat gac aca tca gtt act gtt ata tgg tat ggc aaa aaa tgg cca tgc				725
Asn Asp Thr Ser Val Thr Val Ile Trp Tyr Gly Lys Lys Trp Pro Cys				
	220	225	230	235
cta gca tca ttg tca acc tta gat tta tgt ggc atg aca cca gtt ttt				773



21/84

Leu	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Leu	Asp	Leu	Cys	Gly	Met	Thr	Pro	Val	Phe		
				240					245					250			
acc	gac	tgg	tat	aaa	act	ccc	acc	aaa	cat	aga	ctc	cga	tgg	cat	tct	821	
Thr	Asp	Trp	Tyr	Lys	Thr	Pro	Thr	Lys	His	Arg	Leu	Arg	Trp	His	Ser		
				255				260					265				
tta	att	gca	aag	tac	aat	ctg	agt	cat	ttg	acc	ata	tct	acc	atg	att	869	
Leu	Ile	Ala	Lys	Tyr	Asn	Leu	Ser	His	Leu	Thr	Ile	Ser	Thr	Met	Ile		
				270				275					280				
ggc	tgt	gac	aga	ctc	att	cgg	atc	ttc	tgc	ctg	cac	cct	ggc	ctc	ctg	917	
Gly	Cys	Asp	Arg	Leu	Ile	Arg	Ile	Phe	Cys	Leu	His	Pro	Gly	Leu	Leu		
	285						290				295						
gtg	gga	gtg	tgg	aag	aag	gag	gaa	gaa	ctg	gct	ttt	gtt	atg	gca	aat	965	
Val	Gly	Val	Trp	Lys	Lys	Glu	Glu	Glu	Leu	Ala	Phe	Val	Met	Ala	Asn		
300					305				310						315		
ctt	cat	ttt	cat	cac	ctt	gtg	gag	agg	agc	aca	tta	ggc	tcg	gct	act	1013	
Leu	His	Phe	His	His	Leu	Val	Glu	Arg	Ser	Thr	Leu	Gly	Ser	Ala	Thr		
				320					325					330			
atc	ccc	tat	gaa	ctg	cct	cca	cat	agc	ccc	ttt	ttg	gat	gat	agc	ccc	1061	
Ile	Pro	Tyr	Glu	Leu	Pro	Pro	His	Ser	Pro	Phe	Leu	Asp	Asp	Ser	Pro		
				335				340						345			
gag	tat	gga	ctg	cac	ggc	tac	caa	ctc	cat	gtt	gat	ctg	cac	agc	ggc	1109	
Glu	Tyr	Gly	Leu	His	Gly	Tyr	Gln	Leu	His	Val	Asp	Leu	His	Ser	Gly		
				350				355					360				
ggg	gtt	ttc	tac	cta	tgt	ggt	aca	ttt	cgc	aat	ctc	ttc	acc	aag	aga	1157	
Gly	Val	Phe	Tyr	Leu	Cys	Gly	Thr	Phe	Arg	Asn	Leu	Phe	Thr	Lys	Arg		
				365				370				375					
gga	aat	att	gaa	aat	gga	cat	gtg	aag	ctc	att	gtt	ata	cat	tta	aaa	1205	
Gly	Asn	Ile	Glu	Asn	Gly	His	Val	Lys	Leu	Ile	Val	Ile	His	Leu	Lys		
380					385				390						395		
aat	aac	aga	gaa	cac	cta	cct	ctt	att	gga	aaa	gtt	ggc	ctc	tcg	tgg	1253	
Asn	Asn	Arg	Glu	His	Leu	Pro	Leu	Ile	Gly	Lys	Val	Gly	Leu	Ser	Trp		
				400					405					410			

22/84

aaa act gat att ttt gat ggc tgt ata aag agt tgt tcc atg atg gac 1301  
 Lys Thr Asp Ile Phe Asp Gly Cys Ile Lys Ser Cys Ser Met Met Asp  
                   415                                  420                                  425

gta act ctt ttg gat gaa cat ggg aaa ccc ttt tgg tgt ttc agt tcc 1349  
 Val Thr Leu Leu Asp Glu His Gly Lys Pro Phe Trp Cys Phe Ser Ser  
                   430                                  435                                  440

ccg gtg tgc ctg aga tcg cct gcc aca ccc tct gac agc tct agc ttc 1397  
 Pro Val Cys Leu Arg Ser Pro Ala Thr Pro Ser Asp Ser Ser Ser Phe  
                   445                                  450                                  455

ttg gga cag aca tac aac gtg gac tac gtt gat gcg gaa gga aga gtg 1445  
 Leu Gly Gln Thr Tyr Asn Val Asp Tyr Val Asp Ala Glu Gly Arg Val  
 460                                  465                                  470                                  475

cac gtg gag ctg gtg tgg atc aga gag acc gaa gaa tac ctt att gtc 1493  
 His Val Glu Leu Val Trp Ile Arg Glu Thr Glu Glu Tyr Leu Ile Val  
                                   480                                  485                                  490

aac ctg gtc ctt tat ctt agt atc gca aaa atc aac cat tgg ttt ggg 1541  
 Asn Leu Val Leu Tyr Leu Ser Ile Ala Lys Ile Asn His Trp Phe Gly  
                   495                                  500                                  505

act gaa tat tagcagtagg tggcaaatta ttgttggttat ttagttgttt 1590  
 Thr Glu Tyr  
                   510

atTTTTgact ggctttgttc ttggtgttga aaattaaaat aaagcaaate tgcaaaaaaa 1650

aaaaaaaaaa aaaaaa 1665

<210> 12

<211> 510

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Ala Thr Gly Arg Gly Arg Ile Leu Gln Gln His Trp Leu Gly Leu  
       1                                  5                                  10                                  15

Gln Thr Leu Arg Gly Pro Ser Arg Gly Gly Gly Ala Ala Arg Gly Arg

23/84

20	25	30
Ala Arg Ala Phe Gly Cys Arg Lys Gly Pro Gly Val Lys Leu Ser Ala		
35	40	45
Gly Ser Ala Ala Leu Arg Cys His Ala Gly Gly Gly Gln His Trp Glu		
50	55	60
Ser Ser Phe Ser Cys Cys Ser Gly Phe Leu Asp Gly Met Pro Ser Glu		
65	70	75
Ile Leu Leu Lys Ile Phe Ser Tyr Leu Asp Ala Val Ser Leu Leu Cys		
85	90	95
Thr Gly Cys Val Ser Arg Arg Phe Tyr His Leu Ala Asn Asp Asn Phe		
100	105	110
Ile Trp Ile Gly Ile Tyr Ser Thr Ala Phe Ser Pro Ala Arg Ser Asn		
115	120	125
Trp Lys Phe Asn Ser Val Glu Lys Ile Ala Met Ser Met Ser Phe Leu		
130	135	140
Ser Val Gln Asp Lys Glu Ala Gly Tyr Trp Lys Lys Glu Tyr Ile Thr		
145	150	155
Lys Gln Ile Ala Ser Val Lys Ala Ala Leu Ala Asp Ile Leu Lys Pro		
165	170	175
Val Asn Pro Tyr Thr Gly Leu Pro Val Lys Thr Lys Glu Ala Leu Arg		
180	185	190
Ile Phe Gly Leu Gly Trp Ala Ile Ile Leu Lys Glu Lys Gly Gly Lys		
195	200	205
Glu Tyr Ile Met Glu His Val Asp Leu Ser Ile Asn Asp Thr Ser Val		
210	215	220
Thr Val Ile Trp Tyr Gly Lys Lys Trp Pro Cys Leu Ala Ser Leu Ser		
225	230	235
Thr Leu Asp Leu Cys Gly Met Thr Pro Val Phe Thr Asp Trp Tyr Lys		
245	250	255

24/84

Thr Pro Thr Lys His Arg Leu Arg Trp His Ser Leu Ile Ala Lys Tyr  
 260 265 270

Asn Leu Ser His Leu Thr Ile Ser Thr Met Ile Gly Cys Asp Arg Leu  
 275 280 285

Ile Arg Ile Phe Cys Leu His Pro Gly Leu Leu Val Gly Val Trp Lys  
 290 295 300

Lys Glu Glu Glu Leu Ala Phe Val Met Ala Asn Leu His Phe His His  
 305 310 315 320

Leu Val Glu Arg Ser Thr Leu Gly Ser Ala Thr Ile Pro Tyr Glu Leu  
 325 330 335

Pro Pro His Ser Pro Phe Leu Asp Asp Ser Pro Glu Tyr Gly Leu His  
 340 345 350

Gly Tyr Gln Leu His Val Asp Leu His Ser Gly Gly Val Phe Tyr Leu  
 355 360 365

Cys Gly Thr Phe Arg Asn Leu Phe Thr Lys Arg Gly Asn Ile Glu Asn  
 370 375 380

Gly His Val Lys Leu Ile Val Ile His Leu Lys Asn Asn Arg Glu His  
 385 390 395 400

Leu Pro Leu Ile Gly Lys Val Gly Leu Ser Trp Lys Thr Asp Ile Phe  
 405 410 415

Asp Gly Cys Ile Lys Ser Cys Ser Met Met Asp Val Thr Leu Leu Asp  
 420 425 430

Glu His Gly Lys Pro Phe Trp Cys Phe Ser Ser Pro Val Cys Leu Arg  
 435 440 445

Ser Pro Ala Thr Pro Ser Asp Ser Ser Ser Phe Leu Gly Gln Thr Tyr  
 450 455 460

Asn Val Asp Tyr Val Asp Ala Glu Gly Arg Val His Val Glu Leu Val  
 465 470 475 480

25/84

Trp Ile Arg Glu Thr Glu Glu Tyr Leu Ile Val Asn Leu Val Leu Tyr  
                     485                    490                    495

Leu Ser Ile Ala Lys Ile Asn His Trp Phe Gly Thr Glu Tyr  
                     500                    505                    510

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 2184

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (190).. (1104)

&lt;400&gt; 13

agaaaggctg atttggttgg tgtcttgctc tttctgtggg aaggctgogg ctcaacttcct 60

tccgacttct tgataathtt gcattagaca tttactctt ctttctatga tctttccttc 120

tagacactga gttttttggt tgttgccata aaccttttca gaaatccctt cctcgcctat 180

cacactgac atg agt gtg ggt ctt cct ggt ccc cac agt ttg cct agt tct 231

Met Ser Val Gly Leu Pro Gly Pro His Ser Leu Pro Ser Ser

1

5

10

gag gaa gca tcg aat tct ggg aac gcc tca tca atg cct gca gtt ttt 279

Glu Glu Ala Ser Asn Ser Gly Asn Ala Ser Ser Met Pro Ala Val Phe

15

20

25

30

cat ccc gag aac tat tct tgc tta caa ggg tct gct act gag atg ctc 327

His Pro Glu Asn Tyr Ser Cys Leu Gln Gly Ser Ala Thr Glu Met Leu

35

40

45

tgc aca gag gct gcc tct cct cgc cct tcc tct gaa gac ctg cct ctt 375

Cys Thr Glu Ala Ala Ser Pro Arg Pro Ser Ser Glu Asp Leu Pro Leu

50

55

60

caa ggc agc cct gat tct tct acc agt ccc aaa caa aag ctc tca agt 423

Gln Gly Ser Pro Asp Ser Ser Thr Ser Pro Lys Gln Lys Leu Ser Ser

65

70

75

cct gag gct gac aag ggc cct gag gag gag gag aac aag gtc ctt gcc	471
Pro Glu Ala Asp Lys Gly Pro Glu Glu Glu Glu Asn Lys Val Leu Ala	
80 85 90	
agg aag cag aag atg cgg act gtg ttc tct cag gcc cag ctg tgt gca	519
Arg Lys Gln Lys Met Arg Thr Val Phe Ser Gln Ala Gln Leu Cys Ala	
95 100 105 110	
ctc aag gac agg ttt cag aag cag aag tac ctc agc ctc cag cag atg	567
Leu Lys Asp Arg Phe Gln Lys Gln Lys Tyr Leu Ser Leu Gln Gln Met	
115 120 125	
caa gaa ctc tcc tcc att ctg aac ctg agc tat aag cag gtt aag acc	615
Gln Glu Leu Ser Ser Ile Leu Asn Leu Ser Tyr Lys Gln Val Lys Thr	
130 135 140	
tgg ttt caa aac caa agg gtg aag tgc aag cgg tgg cag aaa aac cag	663
Trp Phe Gln Asn Gln Arg Val Lys Cys Lys Arg Trp Gln Lys Asn Gln	
145 150 155	
tgg ttg aag act agc aat ggt ctg att cag aag ggc tca gca cca gtg	711
Trp Leu Lys Thr Ser Asn Gly Leu Ile Gln Lys Gly Ser Ala Pro Val	
160 165 170	
gag tat ccc agc atc cat tgc agc tat ccc cag ggc tat ctg gtg aac	759
Glu Tyr Pro Ser Ile His Cys Ser Tyr Pro Gln Gly Tyr Leu Val Asn	
175 180 185 190	
gca tct gga agc ctt tcc atg tgg ggc agc cag act tgg acc aac cca	807
Ala Ser Gly Ser Leu Ser Met Trp Gly Ser Gln Thr Trp Thr Asn Pro	
195 200 205	
act tgg agc agc cag acc tgg acc aac cca act tgg aac aac cag acc	855
Thr Trp Ser Ser Gln Thr Trp Thr Asn Pro Thr Trp Asn Asn Gln Thr	
210 215 220	
tgg acc aac cca act tgg agc agc cag gcc tgg acc gct cag tcc tgg	903
Trp Thr Asn Pro Thr Trp Ser Ser Gln Ala Trp Thr Ala Gln Ser Trp	
225 230 235	
aac ggc cag cct tgg aat gct gct ccg ctc cat aac ttc ggg gag gac	951
Asn Gly Gln Pro Trp Asn Ala Ala Pro Leu His Asn Phe Gly Glu Asp	

27/84

240	245	250	
ttt ctg cag cct tac gta cag ttg cag caa aac ttc tct gcc agt gat			999
Phe Leu Gln Pro Tyr Val Gln Leu Gln Gln Asn Phe Ser Ala Ser Asp			
255	260	265	270
ttg gag gtg aat ttg gaa gcc act agg gaa agc cat gcg cat ttt agc			1047
Leu Glu Val Asn Leu Glu Ala Thr Arg Glu Ser His Ala His Phe Ser			
	275	280	285
acc cca caa gcc ttg gaa tta ttc ctg aac tac tct gtg act cca cca			1095
Thr Pro Gln Ala Leu Glu Leu Phe Leu Asn Tyr Ser Val Thr Pro Pro			
	290	295	300
ggt gaa ata tgagacttac gcaacatctg ggcttaaagt cagggcaaag			1144
Gly Glu Ile			
	305		
ccaggttcct tccttcttcc aaatatatttc atattttttt taaagattta tttattcatt			1204
atatgtaagt aactgttagc tgtcttcaga cactccagaa gagggcgta gatcttgta			1264
cgtatggttg tgagccacca tgtggttgct gggatttgaa ctctgacct tcggaagagc			1324
agtcgggtgc tcttatccac tgagccatct caccagcccc tggtttattt ttttaattat			1384
tatttgcttt ttgtttatca agacagggtt tctctgcata gctctaattg tctttgaact			1444
agctctgcag accagcctgg ccttgaactc agagatctgc ccacttatct ttgcctcctg			1504
aatgctggga ccaaaggtgg cataccacca cacctggcat atatattggt tatttctatt			1564
tctatttttta ttggtgccag agcaaacctt ggacttagaa catgctgggc accaactcaa			1624
cttctgagct ctatttataa cttggtgtgt tagtgtattt gtcttagttc tgaatttgct			1684
cttttttttag tgtaaactct aggctttgga gacagtgagg tgcatatact ctctccttcc			1744
caagaataag tgcttgaaca cccttaccba cgcccaccca cccatgctag tcttttttct			1804
tagaagcgtg ggtcttggtt tacactgtgt ctttttgagg ggtgaggttt aaaagtatat			1864
acaaagtata acgatatggt ggctactctc gaggatgaga cagaaggacc aggagtttga			1924

28/84

gggtagctca gatatgcaat aagttcaagg ccaacctgta ctatgtttta atagtaagac 1984  
 agcatctcga taaaataata aaactaaagt ctcaacaaaa taaaagcttt cacctattaa 2044  
 ggtgcttgct tgtccttgga gtccccaag agtaactgct atgttaatat ctgtagaaag 2104  
 atgtttatat ttgactgtac catgatgaac cgatgccagc tggactagtt taaacaaaat 2164  
 aaaacactaa ttttaccttt 2184

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 305

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 14

Met	Ser	Val	Gly	Leu	Pro	Gly	Pro	His	Ser	Leu	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu
1				5					10					15	

Ala	Ser	Asn	Ser	Gly	Asn	Ala	Ser	Ser	Met	Pro	Ala	Val	Phe	His	Pro
			20					25					30		

Glu	Asn	Tyr	Ser	Cys	Leu	Gln	Gly	Ser	Ala	Thr	Glu	Met	Leu	Cys	Thr
		35					40					45			

Glu	Ala	Ala	Ser	Pro	Arg	Pro	Ser	Ser	Glu	Asp	Leu	Pro	Leu	Gln	Gly
	50					55					60				

Ser	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr	Ser	Pro	Lys	Gln	Lys	Leu	Ser	Ser	Pro	Glu
65					70					75					80

Ala	Asp	Lys	Gly	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Asn	Lys	Val	Leu	Ala	Arg	Lys
				85						90				95	

Gln	Lys	Met	Arg	Thr	Val	Phe	Ser	Gln	Ala	Gln	Leu	Cys	Ala	Leu	Lys
				100					105				110		

Asp	Arg	Phe	Gln	Lys	Gln	Lys	Tyr	Leu	Ser	Leu	Gln	Gln	Met	Gln	Glu
		115						120					125		

Leu	Ser	Ser	Ile	Leu	Asn	Leu	Ser	Tyr	Lys	Gln	Val	Lys	Thr	Trp	Phe
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----



29/84

130		135		140
Gln Asn Gln Arg Val Lys Cys Lys Arg Trp Gln Lys Asn Gln Trp Leu				
145		150		155 160
Lys Thr Ser Asn Gly Leu Ile Gln Lys Gly Ser Ala Pro Val Glu Tyr				
	165		170	175
Pro Ser Ile His Cys Ser Tyr Pro Gln Gly Tyr Leu Val Asn Ala Ser				
	180		185	190
Gly Ser Leu Ser Met Trp Gly Ser Gln Thr Trp Thr Asn Pro Thr Trp				
	195		200	205
Ser Ser Gln Thr Trp Thr Asn Pro Thr Trp Asn Asn Gln Thr Trp Thr				
	210		215	220
Asn Pro Thr Trp Ser Ser Gln Ala Trp Thr Ala Gln Ser Trp Asn Gly				
225		230		235 240
Gln Pro Trp Asn Ala Ala Pro Leu His Asn Phe Gly Glu Asp Phe Leu				
	245		250	255
Gln Pro Tyr Val Gln Leu Gln Gln Asn Phe Ser Ala Ser Asp Leu Glu				
	260		265	270
Val Asn Leu Glu Ala Thr Arg Glu Ser His Ala His Phe Ser Thr Pro				
	275		280	285
Gln Ala Leu Glu Leu Phe Leu Asn Tyr Ser Val Thr Pro Pro Gly Glu				
	290		295	300
Ile				
305				

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 2114

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

30/84

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (217).. (1131)

&lt;400&gt; 15

```

attataaatc tagagactcc aggatttttaa cgttctgctg gactgagctg gttgcctcat 60

gttattatgc aggcaactca ctttatccca atttcttgat acttttcctt ctggagggtcc 120

tatttctcta acatcttcca gaaaagtctt aaagctgcct taaccttttt tccagtcac 180

ctcttaaatt ttttctctct cttectctat actaac atg agt gtg gat cca gct 234
                               Met Ser Val Asp Pro Ala
                               1                               5

tgt ccc caa agc ttg cct tgc ttt gaa gca tcc gac tgt aaa gaa tct 282
Cys Pro Gln Ser Leu Pro Cys Phe Glu Ala Ser Asp Cys Lys Glu Ser
                10                15                20

tca cct atg cct gtg att tgt ggg cct gaa gaa aac tat cca tcc ttg 330
Ser Pro Met Pro Val Ile Cys Gly Pro Glu Glu Asn Tyr Pro Ser Leu
                25                30                35

caa atg tct tct gct gag atg cct cac acg gag act gtc tct cct ctt 378
Gln Met Ser Ser Ala Glu Met Pro His Thr Glu Thr Val Ser Pro Leu
                40                45                50

ccc tcc tcc atg gat ctg ctt att cag gac agc cct gat tct tcc acc 426
Pro Ser Ser Met Asp Leu Leu Ile Gln Asp Ser Pro Asp Ser Ser Thr
                55                60                65                70

agt ccc aaa ggc aaa caa ccc act tct gca gag aat agt gtc gca aaa 474
Ser Pro Lys Gly Lys Gln Pro Thr Ser Ala Glu Asn Ser Val Ala Lys
                75                80                85

aag gaa gac aag gtc cca gtc aag aaa cag aag acc aga act gtg ttc 522
Lys Glu Asp Lys Val Pro Val Lys Lys Gln Lys Thr Arg Thr Val Phe
                90                95                100

tct tcc acc cag ctg tgt gta ctc aat gat aga ttt cag aga cag aaa 570
Ser Ser Thr Gln Leu Cys Val Leu Asn Asp Arg Phe Gln Arg Gln Lys
                105                110                115

tac ctc agc ctc cag cag atg caa gaa ctc tcc aac atc ctg aac ctc 618

```

31/84

Tyr	Leu	Ser	Leu	Gln	Gln	Met	Gln	Glu	Leu	Ser	Asn	Ile	Leu	Asn	Leu		
120						125					130						
agc	tac	aaa	cag	gtg	aag	acc	tgg	ttc	cag	aac	cag	aga	atg	aaa	tct	666	
Ser	Tyr	Lys	Gln	Val	Lys	Thr	Trp	Phe	Gln	Asn	Gln	Arg	Met	Lys	Ser		
135					140					145					150		
aag	agg	tgg	cag	aaa	aac	aac	tgg	ccg	aag	aat	agc	aat	ggc	gtg	acg	714	
Lys	Arg	Trp	Gln	Lys	Asn	Asn	Trp	Pro	Lys	Asn	Ser	Asn	Gly	Val	Thr		
				155					160					165			
cag	aag	gcc	tca	gca	cct	acc	tac	ccc	agc	ctc	tac	tct	tcc	tac	cac	762	
Gln	Lys	Ala	Ser	Ala	Pro	Thr	Tyr	Pro	Ser	Leu	Tyr	Ser	Ser	Tyr	His		
			170					175					180				
cag	gga	tgc	ctg	gtg	aac	ccg	act	ggg	aac	ctt	cca	atg	tgg	agc	aac	810	
Gln	Gly	Cys	Leu	Val	Asn	Pro	Thr	Gly	Asn	Leu	Pro	Met	Trp	Ser	Asn		
	185						190					195					
cag	acc	tgg	aac	aat	tca	acc	tgg	agc	aac	cag	acc	cag	aac	atc	cag	858	
Gln	Thr	Trp	Asn	Asn	Ser	Thr	Trp	Ser	Asn	Gln	Thr	Gln	Asn	Ile	Gln		
200						205					210						
tcc	tgg	agc	aac	cac	tcc	tgg	aac	act	cag	acc	tgg	tgc	acc	caa	tcc	906	
Ser	Trp	Ser	Asn	His	Ser	Trp	Asn	Thr	Gln	Thr	Trp	Cys	Thr	Gln	Ser		
215					220					225					230		
tgg	aac	aat	cag	gcc	tgg	aac	agt	ccc	ttc	tat	aac	tgt	gga	gag	gaa	954	
Trp	Asn	Asn	Gln	Ala	Trp	Asn	Ser	Pro	Phe	Tyr	Asn	Cys	Gly	Glu	Glu		
			235					240					245				
tct	ctg	cag	tcc	tgc	atg	cag	ttc	cag	cca	aat	tct	cct	gcc	agt	gac	1002	
Ser	Leu	Gln	Ser	Cys	Met	Gln	Phe	Gln	Pro	Asn	Ser	Pro	Ala	Ser	Asp		
			250					255					260				
ttg	gag	gct	gct	ttg	gaa	gct	gct	ggg	gaa	ggc	ctt	aat	gta	ata	cag	1050	
Leu	Glu	Ala	Ala	Leu	Glu	Ala	Ala	Gly	Glu	Gly	Leu	Asn	Val	Ile	Gln		
	265					270					275						
cag	acc	act	agg	tat	ttt	agt	act	cca	caa	acc	atg	gat	tta	ttc	cta	1098	
Gln	Thr	Thr	Arg	Tyr	Phe	Ser	Thr	Pro	Gln	Thr	Met	Asp	Leu	Phe	Leu		
280						285					290						

32/84

aac tac tcc atg aac atg caa cct gaa gac gtg tgaagatgag tgaaactgat 1151  
 Asn Tyr Ser Met Asn Met Gln Pro Glu Asp Val  
 295 300 305

attactcaat ttcagtctgg acaactggctg aatccttctt ctccccctct cccatccctc 1211  
 ataggatttt tcttggttg aaaccacgtg ttctggtttc catgatgcct atccagtcaa 1271  
 tctcatggag ggtggagtat ggttgagacc taatcagcga ggtttctttt tttttttttc 1331  
 ctattggatc ttcttgaga aaatactttt tttttttttt ttgagacgga gtcttgctct 1391  
 gtcgcccagg ctggagtga gtggcgcggt cttggctcac tgcaagctcc gcctcccggg 1451  
 ttcacgccat tctctgcct cagcctcccg agcagctggg actacaggcg cccgccacct 1511  
 cgcccggtta atattttgta tttttagtag agacagggtt tcaactgtgtt agccaggatg 1571  
 gtctcgatct cctgacctg tgatccgccc gcctcggcct ccctaacage tgggattaca 1631  
 ggctgagcc accgcgcct gcctagaaaa gacattttta taaccttggc tgctaaggac 1691  
 aacattgata gaagccgtct ctggctatag ataagtagat ctaatactag tttggatata 1751  
 tttagggttt agaataaac ctcaagaata agaaatacaa gtacgaattg gtgatgaaga 1811  
 tgtattcgta ttgtttggga ttgggaggct ttgcttattt ttttaaaact attgaggtaa 1871  
 agggttaagc tgtaacatac ttaattgatt tcttaccgtt tttggctctg ttttgctata 1931  
 tcccctaatt tgttggttgt gctaattctt gtagaaagag gtcttgattt tgctgcatcg 1991  
 taatgacatg agtactactt tagttggttt aagttcaaata gaataaaca aatatttttc 2051  
 ctttagttga ttttaccctg atttcaccga gtgtttcgat gagtaaataat acagcttaaa 2111  
 cat 2114

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 305

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

33/84

&lt;400&gt; 16

Met Ser Val Asp Pro Ala Cys Pro Gln Ser Leu Pro Cys Phe Glu Ala  
 1 5 10 15

Ser Asp Cys Lys Glu Ser Ser Pro Met Pro Val Ile Cys Gly Pro Glu  
 20 25 30

Glu Asn Tyr Pro Ser Leu Gln Met Ser Ser Ala Glu Met Pro His Thr  
 35 40 45

Glu Thr Val Ser Pro Leu Pro Ser Ser Met Asp Leu Leu Ile Gln Asp  
 50 55 60

Ser Pro Asp Ser Ser Thr Ser Pro Lys Gly Lys Gln Pro Thr Ser Ala  
 65 70 75 80

Glu Asn Ser Val Ala Lys Lys Glu Asp Lys Val Pro Val Lys Lys Gln  
 85 90 95

Lys Thr Arg Thr Val Phe Ser Ser Thr Gln Leu Cys Val Leu Asn Asp  
 100 105 110

Arg Phe Gln Arg Gln Lys Tyr Leu Ser Leu Gln Gln Met Gln Glu Leu  
 115 120 125

Ser Asn Ile Leu Asn Leu Ser Tyr Lys Gln Val Lys Thr Trp Phe Gln  
 130 135 140

Asn Gln Arg Met Lys Ser Lys Arg Trp Gln Lys Asn Asn Trp Pro Lys  
 145 150 155 160

Asn Ser Asn Gly Val Thr Gln Lys Ala Ser Ala Pro Thr Tyr Pro Ser  
 165 170 175

Leu Tyr Ser Ser Tyr His Gln Gly Cys Leu Val Asn Pro Thr Gly Asn  
 180 185 190

Leu Pro Met Trp Ser Asn Gln Thr Trp Asn Asn Ser Thr Trp Ser Asn  
 195 200 205

Gln Thr Gln Asn Ile Gln Ser Trp Ser Asn His Ser Trp Asn Thr Gln  
 210 215 220

34/84

Thr Trp Cys Thr Gln Ser Trp Asn Asn Gln Ala Trp Asn Ser Pro Phe  
 225 230 235 240

Tyr Asn Cys Gly Glu Glu Ser Leu Gln Ser Cys Met Gln Phe Gln Pro  
 245 250 255

Asn Ser Pro Ala Ser Asp Leu Glu Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Glu  
 260 265 270

Gly Leu Asn Val Ile Gln Gln Thr Thr Arg Tyr Phe Ser Thr Pro Gln  
 275 280 285

Thr Met Asp Leu Phe Leu Asn Tyr Ser Met Asn Met Gln Pro Glu Asp  
 290 295 300

Val  
 305

<210> 17

<211> 1078

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (178).. (858)

<400> 17

caggggtcgg gcaggtggga gggggaagct cacatctcgg ccctctgctg cctctggggg 60

tagggagcat cctaaccgcc aactgtcggg tcagatccgc ctactgcccc tcatcagact 120

gctactcctg ggagcacagc acctgtcttt tacacctctt ccttgagctg ctggggga 177

atg gct ttg cct aca aag tct agc atc ttg gac ctg agc tcc ggc acc 225

Met Ala Leu Pro Thr Lys Ser Ser Ile Leu Asp Leu Ser Ser Gly Thr

1 5 10 15

cca tgc acc aga tct cca gag gaa agt cac gag gct tgg gca cag tgc 273

Pro Cys Thr Arg Ser Pro Glu Glu Ser His Glu Ala Trp Ala Gln Cys

35/84

20	25	30	
aaa gat gct ggc agg cag cta ccc gag tac aag gca gtg gtg gtg ggt			321
Lys Asp Ala Gly Arg Gln Leu Pro Glu Tyr Lys Ala Val Val Val Gly			
35	40	45	
gca agt ggt gtt ggt aaa agt gct ctc acc atc cag atg act cac caa			369
Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Met Thr His Gln			
50	55	60	
tgc ttc gtg aaa gac cat gac ccc act atc caa gat tcc tac tgg aag			417
Cys Phe Val Lys Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser Tyr Trp Lys			
65	70	75	80
gaa gtg gcc agg gac aac gga ggc tac att cta aat gtt ctg gat aca			465
Glu Val Ala Arg Asp Asn Gly Gly Tyr Ile Leu Asn Val Leu Asp Thr			
85	90	95	
tct ggg cag gat att cac cgg gct ctg cgt gac cag tgc ttg gca tct			513
Ser Gly Gln Asp Ile His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys Leu Ala Ser			
100	105	110	
ggt gat ggt gtg ctg ggc gtc ttt gct ctt gac gac ccc tcg tct ctg			561
Gly Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro Ser Ser Leu			
115	120	125	
gac cag ttg cag cag ata tgg tcc acc tgg acc cct cac cac aag cag			609
Asp Gln Leu Gln Gln Ile Trp Ser Thr Trp Thr Pro His His Lys Gln			
130	135	140	
cct ctg gta cta gtg ggc aac aag tgt gac ctg gtg acc act gct gga			657
Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Ala Gly			
145	150	155	160
gat gct cat gct gcc gca gcc ctc ctt gct cac aag ttg ggg gcc ccc			705
Asp Ala His Ala Ala Ala Ala Leu Leu Ala His Lys Leu Gly Ala Pro			
165	170	175	
ttg gtg aag acc tca gcc aag acg cgg caa ggt gtg gag gaa gcc ttt			753
Leu Val Lys Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Glu Ala Phe			
180	185	190	
gcc ctg ctt gtc cat gag att cag agg gcc cag gag gct gtg gcc gaa			801

36/84

Ala Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Ala Gln Glu Ala Val Ala Glu  
 195 200 205

tca agc aag aag acc cga cac cag aaa gcc gtg tgt agc tgt ggc tgc 849  
 Ser Ser Lys Lys Thr Arg His Gln Lys Ala Val Cys Ser Cys Gly Cys  
 210 215 220

tct gta gcc tgaagatctt tgtctagcaa attgaccctt gtctcatgtc 898  
 Ser Val Ala  
 225

aagggtgacaa ttctcttgta ataagatctc cctctccgac caagttacca cagacatctt 958

tttattgtca tttggtgaga agttacgtgg taacatggga catccctcat tgactgtgtt 1018

ttatgaaact ctatgcaaaa ttaaataaat gttttcagga ttcaaagctt cctttatacc 1078

<210> 18

<211> 227

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Met Ala Leu Pro Thr Lys Ser Ser Ile Leu Asp Leu Ser Ser Gly Thr  
 1 5 10 15

Pro Cys Thr Arg Ser Pro Glu Glu Ser His Glu Ala Trp Ala Gln Cys  
 20 25 30

Lys Asp Ala Gly Arg Gln Leu Pro Glu Tyr Lys Ala Val Val Val Gly  
 35 40 45

Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Met Thr His Gln  
 50 55 60

Cys Phe Val Lys Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser Tyr Trp Lys  
 65 70 75 80

Glu Val Ala Arg Asp Asn Gly Gly Tyr Ile Leu Asn Val Leu Asp Thr  
 85 90 95

Ser Gly Gln Asp Ile His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys Leu Ala Ser



37/84

100	105	110
Gly Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro Ser Ser Leu		
115	120	125
Asp Gln Leu Gln Gln Ile Trp Ser Thr Trp Thr Pro His His Lys Gln		
130	135	140
Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Ala Gly		
145	150	155
Asp Ala His Ala Ala Ala Ala Leu Leu Ala His Lys Leu Gly Ala Pro		
165	170	175
Leu Val Lys Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Glu Ala Phe		
180	185	190
Ala Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Ala Gln Glu Ala Val Ala Glu		
195	200	205
Ser Ser Lys Lys Thr Arg His Gln Lys Ala Val Cys Ser Cys Gly Cys		
210	215	220
Ser Val Ala		
225		

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 1266

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (252).. (950)

&lt;400&gt; 19

cgtgaggagg gaaggagaga tggggggacg tgggacaggg agaaaacaac ataatcata 60

tatatatagc atgcaaattg gaaggtgatc agcacacaat aggcattcaa taaatgttga 120

aataatgaca ccccaactgtc tccttgccct caaatggtct cccctaacgt atcccctgtt 180

38/84

gtcttgcttc ttctcttccc acttgacagag cctgctgccc acgtctcttc cctgagctgc 240  
 ctgctgggggt c atg gag ctg cca aca aag cct ggc acc ttc gac ctg ggc 290  
                   Met Glu Leu Pro Thr Lys Pro Gly Thr Phe Asp Leu Gly  
                   1                  5                  10  
 ctg gcc aca tgg agc cct tcc ttc cag ggg gaa acc cac cgg gct cag 338  
 Leu Ala Thr Trp Ser Pro Ser Phe Gln Gly Glu Thr His Arg Ala Gln  
                   15                  20                  25  
 gca cgc cgc agg gat gtt ggc agg cag ctg cct gag tac aag gct gtg 386  
 Ala Arg Arg Arg Asp Val Gly Arg Gln Leu Pro Glu Tyr Lys Ala Val  
                   30                  35                  40                  45  
 gtg gtg ggc gcc agt ggc gtg ggc aag agt gcg ctg acc atc cag ctg 434  
 Val Val Gly Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu  
                   50                  55                  60  
 aac cac cag tgc ttc gtg gag gac cac gac ccc acc atc cag gat tcc 482  
 Asn His Gln Cys Phe Val Glu Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser  
                   65                  70                  75  
 tac tgg aag gag ttg acc ctg gac agt ggg gac tgc att ctg aat gtg 530  
 Tyr Trp Lys Glu Leu Thr Leu Asp Ser Gly Asp Cys Ile Leu Asn Val  
                   80                  85                  90  
 ctg gac aca gca ggg cag gcc atc cat agg gcc ctg cgt gac cag tgc 578  
 Leu Asp Thr Ala Gly Gln Ala Ile His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys  
                   95                  100                  105  
 ctg gct gtc tgt gat ggt gtg ctg ggc gtc ttc gct ctc gat gac ccc 626  
 Leu Ala Val Cys Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro  
                   110                  115                  120                  125  
 tcg tct ctg atc cag ctg cag cag ata tgg gcc acc tgg ggc cct cac 674  
 Ser Ser Leu Ile Gln Leu Gln Gln Ile Trp Ala Thr Trp Gly Pro His  
                   130                  135                  140  
 ccc gcc cag ccc ctt gtc ctc gtg ggc aac aag tgt gac ctt gtg acc 722  
 Pro Ala Gln Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr  
                   145                  150                  155

39/84

act gct gga gat gct cat gcc gct gct gca gcc ctc gca cac agc tgg 770  
 Thr Ala Gly Asp Ala His Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ala His Ser Trp  
 160 165 170

ggg gcc cac ttc gtg gag acc tcg gcc aaa aca cgg caa ggc gtg gag 818  
 Gly Ala His Phe Val Glu Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu  
 175 180 185

gag gcc ttt tcc ctg ctg gtc cat gag atc cag agg gtc cag gag gcc 866  
 Glu Ala Phe Ser Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Val Gln Glu Ala  
 190 195 200 205

atg gcg aag gag ccc atg gca agg tcc tgt agg gag aag acc cgg cac 914  
 Met Ala Lys Glu Pro Met Ala Arg Ser Cys Arg Glu Lys Thr Arg His  
 210 215 220

cag aag gcc acc tgc cac tgt ggc tgc tct gtg gcc tgaaggtctt 960  
 Gln Lys Ala Thr Cys His Cys Gly Cys Ser Val Ala  
 225 230

ggccaagaaa tgtagacctt tccccaggcc aggggtgattg ttcatttgac atgagacccc 1020

tgaggcaact agctttgagg gacacatcag gtatactagg gaaagatgga catctctctt 1080

gttttcactt ggtgaggggc tttttggtaa catgggagtg cctaattgtt cttttgttat 1140

gtcaagttga aagattttgt gcaaaattaa ataaatgggtg ttttgggttt caaagctgcc 1200

tccatgccga gtgttggtgtg ggtgggagtg agactgggta gaatgttact tgagttgtga 1260

gaattc 1266

<210> 20

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Glu Leu Pro Thr Lys Pro Gly Thr Phe Asp Leu Gly Leu Ala Thr  
 1 5 10 15

Trp Ser Pro Ser Phe Gln Gly Glu Thr His Arg Ala Gln Ala Arg Arg

40/84

20	25	30
Arg Asp Val Gly Arg Gln Leu Pro Glu Tyr Lys Ala Val Val Val Gly		
35	40	45
Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Asn His Gln		
50	55	60
Cys Phe Val Glu Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser Tyr Trp Lys		
65	70	75
Glu Leu Thr Leu Asp Ser Gly Asp Cys Ile Leu Asn Val Leu Asp Thr		
85	90	95
Ala Gly Gln Ala Ile His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys Leu Ala Val		
100	105	110
Cys Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro Ser Ser Leu		
115	120	125
Ile Gln Leu Gln Gln Ile Trp Ala Thr Trp Gly Pro His Pro Ala Gln		
130	135	140
Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Ala Gly		
145	150	155
Asp Ala His Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ala His Ser Trp Gly Ala His		
165	170	175
Phe Val Glu Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Glu Ala Phe		
180	185	190
Ser Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Val Gln Glu Ala Met Ala Lys		
195	200	205
Glu Pro Met Ala Arg Ser Cys Arg Glu Lys Thr Arg His Gln Lys Ala		
210	215	220
Thr Cys His Cys Gly Cys Ser Val Ala		
225	230	

41/84

<210> 21  
 <211> 1063  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (177)..(872)

<400> 21  
 gatacaaatt cgaatgtagg tgctaggcgc gcttgtgtta gagtgtttgt taggggagac 60  
 tgatggaatc cacagtccaa tgagtacagg gcctgtcctc cgtgtggcag cttcaccceg 120  
 gagttgctgg cctggctgcc tacctgcttt cctgagatcc agggactttt cccaga atg 179  
 Met  
 1  
 gct ttg ggt gac ctc ctg ctg tct gtc ctc tct gcc cag gaa atg aat 227  
 Ala Leu Gly Asp Leu Leu Leu Ser Val Leu Ser Ala Gln Glu Met Asn  
 5 10 15  
 gcc ctt cgt ggc cag gtg ggc ggg gac gtc aat gtg gag atg gac gcc 275  
 Ala Leu Arg Gly Gln Val Gly Gly Asp Val Asn Val Glu Met Asp Ala  
 20 25 30  
 gcc ccc ggt gtg gac ctg agc cgc atc ctg aac gag atg cgg gat cag 323  
 Ala Pro Gly Val Asp Leu Ser Arg Ile Leu Asn Glu Met Arg Asp Gln  
 35 40 45  
 tat gag aag atg gcg gag aag aac cgc aag gat gct gag gaa tgg ttc 371  
 Tyr Glu Lys Met Ala Glu Lys Asn Arg Lys Asp Ala Glu Glu Trp Phe  
 50 55 60 65  
 ttc acc aag aca gag gag ctg aac cga gaa gtg gcc acc aac acg gag 419  
 Phe Thr Lys Thr Glu Glu Leu Asn Arg Glu Val Ala Thr Asn Thr Glu  
 70 75 80  
 gcc ctg cag agc agc cgg aca gag atc acg gag ctc cgc cgc tct gtg 467  
 Ala Leu Gln Ser Ser Arg Thr Glu Ile Thr Glu Leu Arg Arg Ser Val  
 85 90 95  
 cag aac ctg gag att gag ctg cag tcc cag ctc agc atg aaa gca tca 515

42/84

Gln	Asn	Leu	Glu	Ile	Glu	Leu	Gln	Ser	Gln	Leu	Ser	Met	Lys	Ala	Ser		
	100						105					110					
ctg	gag	aac	agc	ctg	gca	gag	aca	gag	gcg	cgc	tat	ggg	gcc	cag	ctg	563	
Leu	Glu	Asn	Ser	Leu	Ala	Glu	Thr	Glu	Ala	Arg	Tyr	Gly	Ala	Gln	Leu		
	115						120				125						
gcg	cag	ctg	cag	ggc	ctc	att	agc	agt	gtg	gaa	cag	cag	ctg	tgt	gag	611	
Ala	Gln	Leu	Gln	Gly	Leu	Ile	Ser	Ser	Val	Glu	Gln	Gln	Leu	Cys	Glu		
130					135					140				145			
ctg	cgt	tgt	gac	atg	gaa	agg	cag	aat	cat	gag	tac	cag	gtg	ctg	ctg	659	
Leu	Arg	Cys	Asp	Met	Glu	Arg	Gln	Asn	His	Glu	Tyr	Gln	Val	Leu	Leu		
			150					155					160				
gat	gtg	aag	acc	cga	ctg	gag	cag	gag	atc	gcc	acc	tac	cgc	cgt	ctg	707	
Asp	Val	Lys	Thr	Arg	Leu	Glu	Gln	Glu	Ile	Ala	Thr	Tyr	Arg	Arg	Leu		
			165					170					175				
ctg	gag	ggc	gag	gac	gcc	cac	ctg	gct	act	caa	tac	tcc	tca	tcc	ctg	755	
Leu	Glu	Gly	Glu	Asp	Ala	His	Leu	Ala	Thr	Gln	Tyr	Ser	Ser	Ser	Leu		
	180						185					190					
gct	tcg	cag	ccc	tcc	cga	gaa	ggc	atg	gtg	acc	agc	cgc	cag	gtg	cgc	803	
Ala	Ser	Gln	Pro	Ser	Arg	Glu	Gly	Met	Val	Thr	Ser	Arg	Gln	Val	Arg		
	195					200				205							
acc	att	gtg	gag	gaa	gtc	cag	gat	ggt	aag	gtg	ttt	tcc	tcc	aga	gag	851	
Thr	Ile	Val	Glu	Glu	Val	Gln	Asp	Gly	Lys	Val	Phe	Ser	Ser	Arg	Glu		
210					215					220				225			
cag	gag	cac	cgc	tcc	acc	cac	tgaggcccct	gtctgcgtat	gatagcccag							902	
Gln	Glu	His	Arg	Ser	Thr	His											
				230													
gcccaggacc	ttaggctgca	gctccctgca	tctactgcca	agcctgaact	cctatgagct											962	
agctgttgcc	ttctgtgttt	gctttgtgct	gccccttaca	gagaggcccc	ttgggttgac											1022	
cccagaaatt	gctaataaag	ctttgaagaa	gtctgatact	t												1063	

43/84

&lt;211&gt; 232

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 22

Met Ala Leu Gly Asp Leu Leu Leu Ser Val Leu Ser Ala Gln Glu Met  
 1 5 10 15

Asn Ala Leu Arg Gly Gln Val Gly Gly Asp Val Asn Val Glu Met Asp  
 20 25 30

Ala Ala Pro Gly Val Asp Leu Ser Arg Ile Leu Asn Glu Met Arg Asp  
 35 40 45

Gln Tyr Glu Lys Met Ala Glu Lys Asn Arg Lys Asp Ala Glu Glu Trp  
 50 55 60

Phe Phe Thr Lys Thr Glu Glu Leu Asn Arg Glu Val Ala Thr Asn Thr  
 65 70 75 80

Glu Ala Leu Gln Ser Ser Arg Thr Glu Ile Thr Glu Leu Arg Arg Ser  
 85 90 95

Val Gln Asn Leu Glu Ile Glu Leu Gln Ser Gln Leu Ser Met Lys Ala  
 100 105 110

Ser Leu Glu Asn Ser Leu Ala Glu Thr Glu Ala Arg Tyr Gly Ala Gln  
 115 120 125

Leu Ala Gln Leu Gln Gly Leu Ile Ser Ser Val Glu Gln Gln Leu Cys  
 130 135 140

Glu Leu Arg Cys Asp Met Glu Arg Gln Asn His Glu Tyr Gln Val Leu  
 145 150 155 160

Leu Asp Val Lys Thr Arg Leu Glu Gln Glu Ile Ala Thr Tyr Arg Arg  
 165 170 175

Leu Leu Glu Gly Glu Asp Ala His Leu Ala Thr Gln Tyr Ser Ser Ser  
 180 185 190

Leu Ala Ser Gln Pro Ser Arg Glu Gly Met Val Thr Ser Arg Gln Val  
 195 200 205

Arg Thr Ile Val Glu Glu Val Gln Asp Gly Lys Val Phe Ser Ser Arg  
 210 215 220

Glu Gln Glu His Arg Ser Thr His  
 225 230

<210> 23

<211> 1670

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (139).. (1401)

<400> 23

gacaccctca accccatcat cccaggccct cataggctcc atccagcatt acgtcctcat 60

ccctacctac gggttctgac gaccctgctg tcacaccgc catcccttgg acgcagaccc 120

ttctagccga ttacatca atg ggt tcc cgg gag aca cct tct tct tgc tct 171

Met Gly Ser Arg Glu Thr Pro Ser Ser Cys Ser  
 1 5 10

aag acc ctt gaa acc ttg gac ctg gag act tcc gac agc tct agc cct 219

Lys Thr Leu Glu Thr Leu Asp Leu Glu Thr Ser Asp Ser Ser Ser Pro  
 15 20 25

gat gct gac agt cct ctg gaa gag caa tgg ctg aaa tcc tcc cca gcc 267

Asp Ala Asp Ser Pro Leu Glu Glu Gln Trp Leu Lys Ser Ser Pro Ala  
 30 35 40

ctg aag gag gac agt gtg gat gtg gta ctg gaa gac tgc aaa gag cct 315

Leu Lys Glu Asp Ser Val Asp Val Val Leu Glu Asp Cys Lys Glu Pro  
 45 50 55

ctg tcc ccc tcc tcg cct ccg aca ggc aga gag atg atc agg tac gaa 363

Leu Ser Pro Ser Ser Pro Pro Thr Gly Arg Glu Met Ile Arg Tyr Glu  
 60 65 70 75



45/84

gtc aaa gtg aac cga cgg agc att gaa gac atc tgc ctc tgc tgt gga	411
Val Lys Val Asn Arg Arg Ser Ile Glu Asp Ile Cys Leu Cys Cys Gly	
80 85 90	
act ctc cag gtg tac act cgg cac ccc ttg ttt gag gga ggg tta tgt	459
Thr Leu Gln Val Tyr Thr Arg His Pro Leu Phe Glu Gly Gly Leu Cys	
95 100 105	
gcc cca tgt aag gat aag ttc ctg gag tcc ctc ttc ctg tat gat gat	507
Ala Pro Cys Lys Asp Lys Phe Leu Glu Ser Leu Phe Leu Tyr Asp Asp	
110 115 120	
gat gga cac cag agt tac tgc acc atc tgc tgt tcc ggg ggt acc ctg	555
Asp Gly His Gln Ser Tyr Cys Thr Ile Cys Cys Ser Gly Gly Thr Leu	
125 130 135	
ttc atc tgt gag agc ccc gac tgt acc aga tgc tac tgt ttc gag tgt	603
Phe Ile Cys Glu Ser Pro Asp Cys Thr Arg Cys Tyr Cys Phe Glu Cys	
140 145 150 155	
gtg gac atc ctg gtg ggc ccc ggg acc tca gag agg atc aat gcc atg	651
Val Asp Ile Leu Val Gly Pro Gly Thr Ser Glu Arg Ile Asn Ala Met	
160 165 170	
gcc tgc tgg gtt tgc ttc ctg tgc ctg ccc ttc tca cgg agt gga ctg	699
Ala Cys Trp Val Cys Phe Leu Cys Leu Pro Phe Ser Arg Ser Gly Leu	
175 180 185	
ctg cag agg cgc aag agg tgg cgg cac cag ctg aag gcc ttc cat gat	747
Leu Gln Arg Arg Lys Arg Trp Arg His Gln Leu Lys Ala Phe His Asp	
190 195 200	
caa gag gga gcg ggc cct atg gag ata tac aag aca gtg tct gca tgg	795
Gln Glu Gly Ala Gly Pro Met Glu Ile Tyr Lys Thr Val Ser Ala Trp	
205 210 215	
aag aga cag cca gtg cgg gta ctg agc ctt ttt aga aat att gat aaa	843
Lys Arg Gln Pro Val Arg Val Leu Ser Leu Phe Arg Asn Ile Asp Lys	
220 225 230 235	
gta cta aag agt ttg ggc ttt ttg gaa agc ggt tct ggt tct ggg gga	891
Val Leu Lys Ser Leu Gly Phe Leu Glu Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly	
240 245 250	

46/84

gga acg ctg aag tac gtg gaa gat gtc aca aat gtc gtg agg aga gac	939
Gly Thr Leu Lys Tyr Val Glu Asp Val Thr Asn Val Val Arg Arg Asp	
255 260 265	
gtg gag aaa tgg ggc ccc ttt gac ctg gtg tac ggc tcg acg cag ccc	987
Val Glu Lys Trp Gly Pro Phe Asp Leu Val Tyr Gly Ser Thr Gln Pro	
270 275 280	
cta ggc agc tct tgt gat cgc tgt ccc ggc tgg tac atg ttc cag ttc	1035
Leu Gly Ser Ser Cys Asp Arg Cys Pro Gly Trp Tyr Met Phe Gln Phe	
285 290 295	
cac cgg atc ctg cag tat gcg ctg cct cgc cag gag agt cag cgg ccc	1083
His Arg Ile Leu Gln Tyr Ala Leu Pro Arg Gln Glu Ser Gln Arg Pro	
300 305 310 315	
ttc ttc tgg ata ttc atg gac aat ctg ctg ctg act gag gat gac caa	1131
Phe Phe Trp Ile Phe Met Asp Asn Leu Leu Leu Thr Glu Asp Asp Gln	
320 325 330	
gag aca act acc cgc ttc ctt cag aca gag gct gtg acc ctc cag gat	1179
Glu Thr Thr Thr Arg Phe Leu Gln Thr Glu Ala Val Thr Leu Gln Asp	
335 340 345	
gtc cgt ggc aga gac tac cag aat gct atg cgg gtg tgg agc aac att	1227
Val Arg Gly Arg Asp Tyr Gln Asn Ala Met Arg Val Trp Ser Asn Ile	
350 355 360	
cca ggg ctg aag agc aag cat gcg ccc ctg acc cca aag gaa gaa gag	1275
Pro Gly Leu Lys Ser Lys His Ala Pro Leu Thr Pro Lys Glu Glu Glu	
365 370 375	
tat ctg caa gcc caa gtc aga agc agg agc aag ctg gac gcc ccg aaa	1323
Tyr Leu Gln Ala Gln Val Arg Ser Arg Ser Lys Leu Asp Ala Pro Lys	
380 385 390 395	
gtt gac ctc ctg gtg aag aac tgc ctt ctc ccg ctg aga gag tac ttc	1371
Val Asp Leu Leu Val Lys Asn Cys Leu Leu Pro Leu Arg Glu Tyr Phe	
400 405 410	
aag tat ttt tct caa aac tca ctt cct ctt tagaaatgaa tcaccataag	1421
Lys Tyr Phe Ser Gln Asn Ser Leu Pro Leu	

47/84

415

420

atgaaagtct ttcctagaac cagggcagat ttcttcctaa ggtctcttcc ctccacagtt 1481  
 ttctctgggtt tgctttcagg ccttcggggtt tctctcctgt ttgattgccca ggatgcctct 1541  
 gtgcagctca ctttgcgggg tgggaggtgc ctacggctct gcacaagttc ccggtgggat 1601  
 aacctgccat gtttctctga aactgtgtgt acctgttgtg aagtttttca aatatatcat 1661  
 aggattggtt 1670

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 421

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 24

Met	Gly	Ser	Arg	Glu	Thr	Pro	Ser	Ser	Cys	Ser	Lys	Thr	Leu	Glu	Thr
1				5					10					15	
Leu	Asp	Leu	Glu	Thr	Ser	Asp	Ser	Ser	Ser	Pro	Asp	Ala	Asp	Ser	Pro
			20					25						30	
Leu	Glu	Glu	Gln	Trp	Leu	Lys	Ser	Ser	Pro	Ala	Leu	Lys	Glu	Asp	Ser
		35					40					45			
Val	Asp	Val	Val	Leu	Glu	Asp	Cys	Lys	Glu	Pro	Leu	Ser	Pro	Ser	Ser
	50					55					60				
Pro	Pro	Thr	Gly	Arg	Glu	Met	Ile	Arg	Tyr	Glu	Val	Lys	Val	Asn	Arg
65					70				75					80	
Arg	Ser	Ile	Glu	Asp	Ile	Cys	Leu	Cys	Cys	Gly	Thr	Leu	Gln	Val	Tyr
			85						90					95	
Thr	Arg	His	Pro	Leu	Phe	Glu	Gly	Gly	Leu	Cys	Ala	Pro	Cys	Lys	Asp
			100					105					110		
Lys	Phe	Leu	Glu	Ser	Leu	Phe	Leu	Tyr	Asp	Asp	Asp	Gly	His	Gln	Ser
		115					120					125			

48/84

Tyr Cys Thr Ile Cys Cys Ser Gly Gly Thr Leu Phe Ile Cys Glu Ser  
 130 135 140

Pro Asp Cys Thr Arg Cys Tyr Cys Phe Glu Cys Val Asp Ile Leu Val  
 145 150 155 160

Gly Pro Gly Thr Ser Glu Arg Ile Asn Ala Met Ala Cys Trp Val Cys  
 165 170 175

Phe Leu Cys Leu Pro Phe Ser Arg Ser Gly Leu Leu Gln Arg Arg Lys  
 180 185 190

Arg Trp Arg His Gln Leu Lys Ala Phe His Asp Gln Glu Gly Ala Gly  
 195 200 205

Pro Met Glu Ile Tyr Lys Thr Val Ser Ala Trp Lys Arg Gln Pro Val  
 210 215 220

Arg Val Leu Ser Leu Phe Arg Asn Ile Asp Lys Val Leu Lys Ser Leu  
 225 230 235 240

Gly Phe Leu Glu Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Leu Lys Tyr  
 245 250 255

Val Glu Asp Val Thr Asn Val Val Arg Arg Asp Val Glu Lys Trp Gly  
 260 265 270

Pro Phe Asp Leu Val Tyr Gly Ser Thr Gln Pro Leu Gly Ser Ser Cys  
 275 280 285

Asp Arg Cys Pro Gly Trp Tyr Met Phe Gln Phe His Arg Ile Leu Gln  
 290 295 300

Tyr Ala Leu Pro Arg Gln Glu Ser Gln Arg Pro Phe Phe Trp Ile Phe  
 305 310 315 320

Met Asp Asn Leu Leu Leu Thr Glu Asp Asp Gln Glu Thr Thr Thr Arg  
 325 330 335

Phe Leu Gln Thr Glu Ala Val Thr Leu Gln Asp Val Arg Gly Arg Asp  
 340 345 350

Tyr Gln Asn Ala Met Arg Val Trp Ser Asn Ile Pro Gly Leu Lys Ser

49/84

355		360		365
Lys His Ala Pro Leu Thr Pro Lys Glu Glu Glu Tyr Leu Gln Ala Gln				
370		375		380
Val Arg Ser Arg Ser Lys Leu Asp Ala Pro Lys Val Asp Leu Leu Val				
385		390		400
Lys Asn Cys Leu Leu Pro Leu Arg Glu Tyr Phe Lys Tyr Phe Ser Gln				
	405		410	415
Asn Ser Leu Pro Leu				
420				

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 1705

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (485)..(1645)

&lt;400&gt; 25

```

cccatctcca cccctcccct gaaccccact ccccactgag gtccccaac cccaccctc 60
actccaccct gagggcccca tcctctgaac cccaatcccc cagcccact gagctcttaa 120
ccctcccac ctgagggttc ctttccctg cccgtcccc agcttcctag ctccccacc 180
caagtgacct cccgcagctc ctgcccctc ccaactgcaa cggcactga agggctgccc 240
cgccccgcc cctccccgcc cccgcgggac acgcccagat tctttgcccc catagcctgg 300
tgacctctgg ccaccgctg tcccaggtgg gcctggatcc ttccagctca ttctttgcct 360
gcgccgtccc tcgttccatg gccagtcct ccccggggac cctgagcctg gaagccccgg 420
accactggaa ccttgaacct accagctggc tgtaccgga gccgtggcag cagccctcat 480
cccc atg gcg gcc atc cca gcc ctg gac cca gag gcc gag ccc agc atg 529

```

50/84

Met	Ala	Ala	Ile	Pro	Ala	Leu	Asp	Pro	Glu	Ala	Glu	Pro	Ser	Met		
1				5					10					15		
gac gtg att ttg gtg gga tcc agt gag ctc tca agc tcc gtt tca ccc 577																
Asp	Val	Ile	Leu	Val	Gly	Ser	Ser	Glu	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Pro	
			20						25					30		
ggg aca ggc aga gat ctt att gca tat gaa gtc aag gct aac cag cga 625																
Gly	Thr	Gly	Arg	Asp	Leu	Ile	Ala	Tyr	Glu	Val	Lys	Ala	Asn	Gln	Arg	
			35					40					45			
aat ata gaa gac atc tgc atc tgc tgc gga agt ctc cag gtt cac aca 673																
Asn	Ile	Glu	Asp	Ile	Cys	Ile	Cys	Cys	Gly	Ser	Leu	Gln	Val	His	Thr	
		50					55					60				
cag cac cct ctg ttt gag gga ggg atc tgc gcc cca tgt aag gac aag 721																
Gln	His	Pro	Leu	Phe	Glu	Gly	Gly	Ile	Cys	Ala	Pro	Cys	Lys	Asp	Lys	
		65				70					75					
ttc ctg gat gcc ctc ttc ctg tac gac gat gac ggg tac caa tcc tac 769																
Phe	Leu	Asp	Ala	Leu	Phe	Leu	Tyr	Asp	Asp	Asp	Gly	Tyr	Gln	Ser	Tyr	
80					85				90						95	
tgc tcc atc tgc tgc tcc gga gag acg ctg ctc atc tgc gga aac cct 817																
Cys	Ser	Ile	Cys	Cys	Ser	Gly	Glu	Thr	Leu	Leu	Ile	Cys	Gly	Asn	Pro	
			100						105					110		
gat tgc acc cga tgc tac tgc ttc gag tgt gtg gat agc ctg gtc ggc 865																
Asp	Cys	Thr	Arg	Cys	Tyr	Cys	Phe	Glu	Cys	Val	Asp	Ser	Leu	Val	Gly	
			115					120					125			
ccc ggg acc tcg ggg aag gtg cac gcc atg agc aac tgg gtg tgc tac 913																
Pro	Gly	Thr	Ser	Gly	Lys	Val	His	Ala	Met	Ser	Asn	Trp	Val	Cys	Tyr	
		130					135					140				
ctg tgc ctg ccg tcc tcc cga agc ggg ctg ctg cag cgt cgg agg aag 961																
Leu	Cys	Leu	Pro	Ser	Ser	Arg	Ser	Gly	Leu	Leu	Gln	Arg	Arg	Arg	Lys	
		145				150					155					
tgg cgc agc cag ctc aag gcc ttc tac gac cga gag tcg gag aat ccc 1009																
Trp	Arg	Ser	Gln	Leu	Lys	Ala	Phe	Tyr	Asp	Arg	Glu	Ser	Glu	Asn	Pro	
160					165					170					175	

51/84

ctt gag atg ttc gaa acc gtg cct gtg tgg agg aga cag cca gtc cgg	1057
Leu Glu Met Phe Glu Thr Val Pro Val Trp Arg Arg Gln Pro Val Arg	
180 185 190	
gtg ctg tcc ctt ttt gaa gac atc aag aaa gag ctg acg agt ttg ggc	1105
Val Leu Ser Leu Phe Glu Asp Ile Lys Lys Glu Leu Thr Ser Leu Gly	
195 200 205	
ttt ttg gaa agt ggt tct gac ccg gga caa ctg aag cat gtg gtt gat	1153
Phe Leu Glu Ser Gly Ser Asp Pro Gly Gln Leu Lys His Val Val Asp	
210 215 220	
gtc aca gac aca gtg agg aag gat gtg gag gag tgg gga ccc ttc gat	1201
Val Thr Asp Thr Val Arg Lys Asp Val Glu Glu Trp Gly Pro Phe Asp	
225 230 235	
ctt gtg tac ggc gcc aca gct ccc ctg ggc cac acc tgt gac cgt cct	1249
Leu Val Tyr Gly Ala Thr Ala Pro Leu Gly His Thr Cys Asp Arg Pro	
240 245 250 255	
ccc agc tgg tac ctg ttc cag ttc cac cgg ttc ctg cag tac gca cgg	1297
Pro Ser Trp Tyr Leu Phe Gln Phe His Arg Phe Leu Gln Tyr Ala Arg	
260 265 270	
ccc aag cca ggc agc ccc agg ccc ttc ttc tgg atg ttc gtg gac aat	1345
Pro Lys Pro Gly Ser Pro Arg Pro Phe Phe Trp Met Phe Val Asp Asn	
275 280 285	
ctg gtg ctg aac aag gaa gac ctg gac gtc gca tct cgc ttc ctg gag	1393
Leu Val Leu Asn Lys Glu Asp Leu Asp Val Ala Ser Arg Phe Leu Glu	
290 295 300	
atg gag cca gtc acc atc cca gat gtc cac ggc gga tcc ttg cag aat	1441
Met Glu Pro Val Thr Ile Pro Asp Val His Gly Gly Ser Leu Gln Asn	
305 310 315	
gct gtc cgc gtg tgg agc aac atc cca gcc ata agg agc agc agg cac	1489
Ala Val Arg Val Trp Ser Asn Ile Pro Ala Ile Arg Ser Ser Arg His	
320 325 330 335	
tgg gct ctg gtt tcg gaa gaa gaa ttg tcc ctg ctg gcc cag aac aag	1537
Trp Ala Leu Val Ser Glu Glu Glu Leu Ser Leu Leu Ala Gln Asn Lys	
340 345 350	

52/84

cag agc tcg aag ctc gcg gcc aag tgg ccc acc aag ctg gtg aag aac 1585  
 Gln Ser Ser Lys Leu Ala Ala Lys Trp Pro Thr Lys Leu Val Lys Asn  
                   355                                  360                                  365

tgc ttt ctc ccc cta aga gaa tat ttc aag tat ttt tca aca gaa ctc 1633  
 Cys Phe Leu Pro Leu Arg Glu Tyr Phe Lys Tyr Phe Ser Thr Glu Leu  
                   370                                  375                                  380

act tcc tct tta taaatgagtc actatactgt gaagaaaaag acttttccta 1685  
 Thr Ser Ser Leu  
                   385

gaacaaaggc aactttcctc 1705

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 387

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 26

Met Ala Ala Ile Pro Ala Leu Asp Pro Glu Ala Glu Pro Ser Met Asp  
       1                                  5                                  10                                  15

Val Ile Leu Val Gly Ser Ser Glu Leu Ser Ser Ser Val Ser Pro Gly  
                   20                                  25                                  30

Thr Gly Arg Asp Leu Ile Ala Tyr Glu Val Lys Ala Asn Gln Arg Asn  
                   35                                  40                                  45

Ile Glu Asp Ile Cys Ile Cys Cys Gly Ser Leu Gln Val His Thr Gln  
                   50                                  55                                  60

His Pro Leu Phe Glu Gly Gly Ile Cys Ala Pro Cys Lys Asp Lys Phe  
       65                                  70                                  75                                  80

Leu Asp Ala Leu Phe Leu Tyr Asp Asp Asp Gly Tyr Gln Ser Tyr Cys  
                   85                                  90                                  95

Ser Ile Cys Cys Ser Gly Glu Thr Leu Leu Ile Cys Gly Asn Pro Asp  
                   100                                  105                                  110



53/84

Cys	Thr	Arg	Cys	Tyr	Cys	Phe	Glu	Cys	Val	Asp	Ser	Leu	Val	Gly	Pro	115	120	125
Gly	Thr	Ser	Gly	Lys	Val	His	Ala	Met	Ser	Asn	Trp	Val	Cys	Tyr	Leu	130	135	140
Cys	Leu	Pro	Ser	Ser	Arg	Ser	Gly	Leu	Leu	Gln	Arg	Arg	Arg	Lys	Trp	145	150	155
Arg	Ser	Gln	Leu	Lys	Ala	Phe	Tyr	Asp	Arg	Glu	Ser	Glu	Asn	Pro	Leu	165	170	175
Glu	Met	Phe	Glu	Thr	Val	Pro	Val	Trp	Arg	Arg	Gln	Pro	Val	Arg	Val	180	185	190
Leu	Ser	Leu	Phe	Glu	Asp	Ile	Lys	Lys	Glu	Leu	Thr	Ser	Leu	Gly	Phe	195	200	205
Leu	Glu	Ser	Gly	Ser	Asp	Pro	Gly	Gln	Leu	Lys	His	Val	Val	Asp	Val	210	215	220
Thr	Asp	Thr	Val	Arg	Lys	Asp	Val	Glu	Glu	Trp	Gly	Pro	Phe	Asp	Leu	225	230	235
Val	Tyr	Gly	Ala	Thr	Ala	Pro	Leu	Gly	His	Thr	Cys	Asp	Arg	Pro	Pro	245	250	255
Ser	Trp	Tyr	Leu	Phe	Gln	Phe	His	Arg	Phe	Leu	Gln	Tyr	Ala	Arg	Pro	260	265	270
Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Arg	Pro	Phe	Phe	Trp	Met	Phe	Val	Asp	Asn	Leu	275	280	285
Val	Leu	Asn	Lys	Glu	Asp	Leu	Asp	Val	Ala	Ser	Arg	Phe	Leu	Glu	Met	290	295	300
Glu	Pro	Val	Thr	Ile	Pro	Asp	Val	His	Gly	Gly	Ser	Leu	Gln	Asn	Ala	305	310	315
Val	Arg	Val	Trp	Ser	Asn	Ile	Pro	Ala	Ile	Arg	Ser	Ser	Arg	His	Trp	325	330	335
Ala	Leu	Val	Ser	Glu	Glu	Glu	Leu	Ser	Leu	Leu	Ala	Gln	Asn	Lys	Gln			

350

ttc tat aac agc atg tgt cag gac gta gaa atg aaa cca tta atg ctg 317  
Phe Tyr Asn Ser Met Cys Gln Asp Val Glu Met Lys Pro Leu Met Leu  
45 50 55

55/84

gaa gaa ggg cag gtg tgt gtg gtg tac tgc cag gag ctg aag tgc tgg	365
Glu Glu Gly Gln Val Cys Val Val Tyr Cys Gln Glu Leu Lys Cys Trp	
60 65 70	
tgc agg gct ctg att aag tcc atc atc tct tct gca gac cat tac ctg	413
Cys Arg Ala Leu Ile Lys Ser Ile Ile Ser Ser Ala Asp His Tyr Leu	
75 80 85	
gca gag tgt ttc ctg gtc gat ttt gcc aag tat att cca gta aaa tct	461
Ala Glu Cys Phe Leu Val Asp Phe Ala Lys Tyr Ile Pro Val Lys Ser	
90 95 100 105	
aaa aac atc cga gtt gca gta gag tct ttt atg cag ctt cct tac aga	509
Lys Asn Ile Arg Val Ala Val Glu Ser Phe Met Gln Leu Pro Tyr Arg	
110 115 120	
gca aaa aaa ttc aga ctt tac ggt aca aag cct gtg aca ttg cac att	557
Ala Lys Lys Phe Arg Leu Tyr Gly Thr Lys Pro Val Thr Leu His Ile	
125 130 135	
gac ttc tgt gaa gac aat gct gag att gta cct gcc aca aaa tgg gac	605
Asp Phe Cys Glu Asp Asn Ala Glu Ile Val Pro Ala Thr Lys Trp Asp	
140 145 150	
agt gca gcc atc cag tac ttt cag aac ctt cta aga gca act acc caa	653
Ser Ala Ala Ile Gln Tyr Phe Gln Asn Leu Leu Arg Ala Thr Thr Gln	
155 160 165	
gtg gaa gca aaa cta tgt gcg gtg gaa gaa gat act ttt gag gtt tac	701
Val Glu Ala Lys Leu Cys Ala Val Glu Glu Asp Thr Phe Glu Val Tyr	
170 175 180 185	
ctt tat gca aca ata aaa aat gaa aaa gtt tgt gtt aat gat gac cta	749
Leu Tyr Ala Thr Ile Lys Asn Glu Lys Val Cys Val Asn Asp Asp Leu	
190 195 200	
gtt gca aag aat ttt gct tat tat gtg tca cca atg ggg aat aaa aac	797
Val Ala Lys Asn Phe Ala Tyr Tyr Val Ser Pro Met Gly Asn Lys Asn	
205 210 215	
ctc aat cct ttg gag aaa ccc agg cag agt ctc aat tcg gtg acc tgc	845
Leu Asn Pro Leu Glu Lys Pro Arg Gln Ser Leu Asn Ser Val Thr Cys	
220 225 230	

56/84

tcc agt aag ctc agc cca tca ctt act ctg tgg cca atg ctt cta caa	893
Ser Ser Lys Leu Ser Pro Ser Leu Thr Leu Trp Pro Met Leu Leu Gln	
235 240 245	
gga aaa gac tat cac aga atg gaa aat aaa gct cta aac tat aag gat	941
Gly Lys Asp Tyr His Arg Met Glu Asn Lys Ala Leu Asn Tyr Lys Asp	
250 255 260 265	
tcc ttg aca gac tcg cct aaa atg atg ctt gag aag cag cag cag agc	989
Ser Leu Thr Asp Ser Pro Lys Met Met Leu Glu Lys Gln Gln Gln Ser	
270 275 280	
ctc cct tta aag cac acg gag aag tgt act gaa tct tct gtg tac tgg	1037
Leu Pro Leu Lys His Thr Glu Lys Cys Thr Glu Ser Ser Val Tyr Trp	
285 290 295	
cca acc aaa aga ggc ata acc ata tat gct gat cca gat gtt cca tca	1085
Pro Thr Lys Arg Gly Ile Thr Ile Tyr Ala Asp Pro Asp Val Pro Ser	
300 305 310	
gta agt ggg tct agc cag agg ccg aat gag aag cca ctg cgg ttg act	1133
Val Ser Gly Ser Ser Gln Arg Pro Asn Glu Lys Pro Leu Arg Leu Thr	
315 320 325	
gaa aag aaa gac tgt gac gag aag aac ggc tgt gta aaa tta ctg cag	1181
Glu Lys Lys Asp Cys Asp Glu Lys Asn Gly Cys Val Lys Leu Leu Gln	
330 335 340 345	
ttt cta aat cct gat cct ttg aga gct gat ggg acc tca gac ctg cac	1229
Phe Leu Asn Pro Asp Pro Leu Arg Ala Asp Gly Thr Ser Asp Leu His	
350 355 360	
cag ttg cag aag gtg aag ctg ggc aca ctg cag cct ggg gtg gtg ctc	1277
Gln Leu Gln Lys Val Lys Leu Gly Thr Leu Gln Pro Gly Val Val Leu	
365 370 375	
cgg aac agg atc gag ccc tgc cta acc ctg gag aaa tca cct ctg tcg	1325
Arg Asn Arg Ile Glu Pro Cys Leu Thr Leu Glu Lys Ser Pro Leu Ser	
380 385 390	
gca gac ctg aag aag gtg aac atg ttc tta aag cca gac tcc	1367
Ala Asp Leu Lys Lys Val Asn Met Phe Leu Lys Pro Asp Ser	

57/84

395

400

405

tgacgacatg ccagcccttt ccaacacaga gtgttgcttt gttttgcttt gtctgttctg 1427  
 ttctaagagt gacggggatg aaatacaggg ctttgcgcggt cctgggcatg cattcatcac 1487  
 tgaaccatac cccaattcca taggaggatt ttaaataaac acttctaagg ctacattgca 1547  
 gaattcttgc tcc 1560

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 407

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 28

Met Phe Glu Val Leu Val Leu Lys Ile Glu Asp Pro Gly Cys Phe Trp  
 1 5 10 15

Val Ile Ile Lys Gly Cys Ser His Phe Leu Glu Gln Glu Val Asp Tyr  
 20 25 30

Gln Lys Leu Asn Thr Ala Met Asn Asp Phe Tyr Asn Ser Met Cys Gln  
 35 40 45

Asp Val Glu Met Lys Pro Leu Met Leu Glu Glu Gly Gln Val Cys Val  
 50 55 60

Val Tyr Cys Gln Glu Leu Lys Cys Trp Cys Arg Ala Leu Ile Lys Ser  
 65 70 75 80

Ile Ile Ser Ser Ala Asp His Tyr Leu Ala Glu Cys Phe Leu Val Asp  
 85 90 95

Phe Ala Lys Tyr Ile Pro Val Lys Ser Lys Asn Ile Arg Val Ala Val  
 100 105 110

Glu Ser Phe Met Gln Leu Pro Tyr Arg Ala Lys Lys Phe Arg Leu Tyr  
 115 120 125

Gly Thr Lys Pro Val Thr Leu His Ile Asp Phe Cys Glu Asp Asn Ala  
 130 135 140

58/84

Glu	Ile	Val	Pro	Ala	Thr	Lys	Trp	Asp	Ser	Ala	Ala	Ile	Gln	Tyr	Phe	145	150	155	160
Gln	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	Thr	Thr	Gln	Val	Glu	Ala	Lys	Leu	Cys	Ala	165	170	175	
Val	Glu	Glu	Asp	Thr	Phe	Glu	Val	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Thr	Ile	Lys	Asn	180	185	190	
Glu	Lys	Val	Cys	Val	Asn	Asp	Asp	Leu	Val	Ala	Lys	Asn	Phe	Ala	Tyr	195	200	205	
Tyr	Val	Ser	Pro	Met	Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Asn	Pro	Leu	Glu	Lys	Pro	210	215	220	
Arg	Gln	Ser	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Cys	Ser	Ser	Lys	Leu	Ser	Pro	Ser	225	230	235	240
Leu	Thr	Leu	Trp	Pro	Met	Leu	Leu	Gln	Gly	Lys	Asp	Tyr	His	Arg	Met	245	250	255	
Glu	Asn	Lys	Ala	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asp	Ser	Leu	Thr	Asp	Ser	Pro	Lys	260	265	270	
Met	Met	Leu	Glu	Lys	Gln	Gln	Gln	Ser	Leu	Pro	Leu	Lys	His	Thr	Glu	275	280	285	
Lys	Cys	Thr	Glu	Ser	Ser	Val	Tyr	Trp	Pro	Thr	Lys	Arg	Gly	Ile	Thr	290	295	300	
Ile	Tyr	Ala	Asp	Pro	Asp	Val	Pro	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Ser	Gln	Arg	305	310	315	320
Pro	Asn	Glu	Lys	Pro	Leu	Arg	Leu	Thr	Glu	Lys	Lys	Asp	Cys	Asp	Glu	325	330	335	
Lys	Asn	Gly	Cys	Val	Lys	Leu	Leu	Gln	Phe	Leu	Asn	Pro	Asp	Pro	Leu	340	345	350	
Arg	Ala	Asp	Gly	Thr	Ser	Asp	Leu	His	Gln	Leu	Gln	Lys	Val	Lys	Leu	355	360	365	

59/84

Gly Thr Leu Gln Pro Gly Val Val Leu Arg Asn Arg Ile Glu Pro Cys  
 370 375 380

Leu Thr Leu Glu Lys Ser Pro Leu Ser Ala Asp Leu Lys Lys Val Asn  
 385 390 395 400

Met Phe Leu Lys Pro Asp Ser  
 405

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 1301

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (97).. (1167)

&lt;400&gt; 29

ttacagattg aagatccagg ttgcttctgg gttattataa aagggtgtag tcccttttta 60

gatcatgatg tcgattatca aaaattaaat agtgcc atg aat gac ttc tac aac 114  
 Met Asn Asp Phe Tyr Asn  
 1 5

agc acg tgt caa gat ata gaa ata aaa ccc tta aca ttg gaa gaa gga 162  
 Ser Thr Cys Gln Asp Ile Glu Ile Lys Pro Leu Thr Leu Glu Glu Gly  
 10 15 20

cag gtg tgt gtg gtc tat tgt gag gag cta aag tgc tgg tgc agg gcc 210  
 Gln Val Cys Val Val Tyr Cys Glu Glu Leu Lys Cys Trp Cys Arg Ala  
 25 30 35

att gtc aaa tca att acg tct tcc gca gac cag tac ctg gca gaa tgt 258  
 Ile Val Lys Ser Ile Thr Ser Ser Ala Asp Gln Tyr Leu Ala Glu Cys  
 40 45 50

ttc ctt gtg gac ttt gcc aag aac att cca gtc aaa tct aaa agc atc 306  
 Phe Leu Val Asp Phe Ala Lys Asn Ile Pro Val Lys Ser Lys Ser Ile  
 55 60 65 70

60/84

cga gtt gta gta gaa tcg ttt atg cag ctt ccc tat aga gca aaa aaa	354
Arg Val Val Val Glu Ser Phe Met Gln Leu Pro Tyr Arg Ala Lys Lys	
75 80 85	
ttc agc ctg tac tgc aca aag cct gtc aca tta cac att gac ttc tgc	402
Phe Ser Leu Tyr Cys Thr Lys Pro Val Thr Leu His Ile Asp Phe Cys	
90 95 100	
cga gac agt act gac att gtg cct gcc aag aag tgg gac aat gca gct	450
Arg Asp Ser Thr Asp Ile Val Pro Ala Lys Lys Trp Asp Asn Ala Ala	
105 110 115	
att cag tac ttt cag aac ctt ctg aaa gca act acc cag gtg gaa gcc	498
Ile Gln Tyr Phe Gln Asn Leu Leu Lys Ala Thr Thr Gln Val Glu Ala	
120 125 130	
aga tta tgt gct gtg gaa gaa gat aca ttt gag gtt tac ctt tat gta	546
Arg Leu Cys Ala Val Glu Glu Asp Thr Phe Glu Val Tyr Leu Tyr Val	
135 140 145 150	
act ata aaa gat gaa aaa gtt tgt gtt aat gat gat ctt gtt gca aag	594
Thr Ile Lys Asp Glu Lys Val Cys Val Asn Asp Asp Leu Val Ala Lys	
155 160 165	
aac tat gct tgt tat atg tca cct aca aag aat aaa aac ctt gat tat	642
Asn Tyr Ala Cys Tyr Met Ser Pro Thr Lys Asn Lys Asn Leu Asp Tyr	
170 175 180	
tta gaa aaa cca aga ttg aat ata aaa tca gca ccc tcc ttc aat aaa	690
Leu Glu Lys Pro Arg Leu Asn Ile Lys Ser Ala Pro Ser Phe Asn Lys	
185 190 195	
ctc aat cca gca ctt aca ctc tgg cca atg ttt ttg caa gga aaa gat	738
Leu Asn Pro Ala Leu Thr Leu Trp Pro Met Phe Leu Gln Gly Lys Asp	
200 205 210	
gtt caa gga atg gaa gat tca cat ggt gta aat ttt ccg gca caa tct	786
Val Gln Gly Met Glu Asp Ser His Gly Val Asn Phe Pro Ala Gln Ser	
215 220 225 230	
ctg caa cat aca tgg tgc aag ggt att gtc ggt gac ctc agg cca aca	834
Leu Gln His Thr Trp Cys Lys Gly Ile Val Gly Asp Leu Arg Pro Thr	
235 240 245	



61/84

```

gcc aca gca cag gac aaa gct gta aaa tgt aat atg gat tca ttg aga 882
Ala Thr Ala Gln Asp Lys Ala Val Lys Cys Asn Met Asp Ser Leu Arg
                250                255                260

gat tca cct aaa gac aaa tct gaa aag aaa cac cat tgc atc tct tta 930
Asp Ser Pro Lys Asp Lys Ser Glu Lys Lys His His Cys Ile Ser Leu
                265                270                275

aaa gat aca aat aag cgt gtt gaa tcc tca gtg tac tgg cca gca aaa 978
Lys Asp Thr Asn Lys Arg Val Glu Ser Ser Val Tyr Trp Pro Ala Lys
                280                285                290

aga ggc ata acc ata tat gct gat cca gat gta cca gaa gca agt gct 1026
Arg Gly Ile Thr Ile Tyr Ala Asp Pro Asp Val Pro Glu Ala Ser Ala
295                300                305                310

tta agt cag aag tca aat gag aaa cct ctt aga ttg act gag aag aaa 1074
Leu Ser Gln Lys Ser Asn Glu Lys Pro Leu Arg Leu Thr Glu Lys Lys
                315                320                325

gaa tat gat gag aag aat agc tgt gtg aaa tta ctg cag ttt tta aat 1122
Glu Tyr Asp Glu Lys Asn Ser Cys Val Lys Leu Leu Gln Phe Leu Asn
                330                335                340

cct gat cct ttg aga gct gac gga atc tct gat ctc cag cag act 1167
Pro Asp Pro Leu Arg Ala Asp Gly Ile Ser Asp Leu Gln Gln Thr
                345                350                355

tgagattaga agagaaactc cttagatggg ggacttaacc tgaagacatc cttttagaaa 1227

cgatcgaatg gattgttgct tctgagaaat tgttccttgt tttttggata ataaacgata 1287

ttccttttgg taaa 1301

```

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 357

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 30

Met Asn Asp Phe Tyr Asn Ser Thr Cys Gln Asp Ile Glu Ile Lys Pro

62/84

1	5	10	15
Leu Thr Leu Glu Glu Gly Gln Val Cys Val Val Tyr Cys Glu Glu Leu	20	25	30
Lys Cys Trp Cys Arg Ala Ile Val Lys Ser Ile Thr Ser Ser Ala Asp	35	40	45
Gln Tyr Leu Ala Glu Cys Phe Leu Val Asp Phe Ala Lys Asn Ile Pro	50	55	60
Val Lys Ser Lys Ser Ile Arg Val Val Val Glu Ser Phe Met Gln Leu	65	70	75
Pro Tyr Arg Ala Lys Lys Phe Ser Leu Tyr Cys Thr Lys Pro Val Thr	85	90	95
Leu His Ile Asp Phe Cys Arg Asp Ser Thr Asp Ile Val Pro Ala Lys	100	105	110
Lys Trp Asp Asn Ala Ala Ile Gln Tyr Phe Gln Asn Leu Leu Lys Ala	115	120	125
Thr Thr Gln Val Glu Ala Arg Leu Cys Ala Val Glu Glu Asp Thr Phe	130	135	140
Glu Val Tyr Leu Tyr Val Thr Ile Lys Asp Glu Lys Val Cys Val Asn	145	150	155
Asp Asp Leu Val Ala Lys Asn Tyr Ala Cys Tyr Met Ser Pro Thr Lys	165	170	175
Asn Lys Asn Leu Asp Tyr Leu Glu Lys Pro Arg Leu Asn Ile Lys Ser	180	185	190
Ala Pro Ser Phe Asn Lys Leu Asn Pro Ala Leu Thr Leu Trp Pro Met	195	200	205
Phe Leu Gln Gly Lys Asp Val Gln Gly Met Glu Asp Ser His Gly Val	210	215	220
Asn Phe Pro Ala Gln Ser Leu Gln His Thr Trp Cys Lys Gly Ile Val	225	230	235
			240

c atg cag cct tat caa cgg ctt ctg gcg ctt ggc ttc ctt ctg tta acc 169  
Met Gln Pro Tyr Gln Arg Leu Leu Ala Leu Gly Phe Leu Leu Leu Thr

64/84

1	5	10	15	
ctg ccc tgg ggc cag aca tcc gag ttt caa gac tct gac ctt ttg cag				217
Leu Pro Trp Gly Gln Thr Ser Glu Phe Gln Asp Ser Asp Leu Leu Gln				
	20	25	30	
ttt ctg gga tta gag aaa gcg cct tca cct cac agg ttc caa cct gtg				265
Phe Leu Gly Leu Glu Lys Ala Pro Ser Pro His Arg Phe Gln Pro Val				
	35	40	45	
cct cgc gtc tta agg aaa atc atc cgg gct cga gaa gcc gct gca gcc				313
Pro Arg Val Leu Arg Lys Ile Ile Arg Ala Arg Glu Ala Ala Ala Ala				
	50	55	60	
agt ggg gcc tcg cag gac tta tgc tac gtg aag gag ctg ggt gtt cgt				361
Ser Gly Ala Ser Gln Asp Leu Cys Tyr Val Lys Glu Leu Gly Val Arg				
65	70	75	80	
ggg aac ctg ctt cag ctt ctc cca gac cag ggt ttt ttc ctt aat aca				409
Gly Asn Leu Leu Gln Leu Leu Pro Asp Gln Gly Phe Phe Leu Asn Thr				
	85	90	95	
cag aaa cct ttc caa gat ggc tcc tgt ctc cag aag gtc ctc tat ttt				457
Gln Lys Pro Phe Gln Asp Gly Ser Cys Leu Gln Lys Val Leu Tyr Phe				
	100	105	110	
aac ttg tct gcc atc aaa gaa aag gca aag ttg acc atg gcc cag ctg				505
Asn Leu Ser Ala Ile Lys Glu Lys Ala Lys Leu Thr Met Ala Gln Leu				
	115	120	125	
act cta gac ttg ggg ccc agg tcc tac tat aac ctg cga cca gag ctg				553
Thr Leu Asp Leu Gly Pro Arg Ser Tyr Tyr Asn Leu Arg Pro Glu Leu				
	130	135	140	
gtg gtt gct ctg tct gtg gtt cag gac cgg ggc gtg tgg ggg cga tcc				601
Val Val Ala Leu Ser Val Val Gln Asp Arg Gly Val Trp Gly Arg Ser				
145	150	155	160	
cac cct aag gtg ggc aga ttg ctt ttt ctg cgg tct gtc cct ggg cct				649
His Pro Lys Val Gly Arg Leu Leu Phe Leu Arg Ser Val Pro Gly Pro				
	165	170	175	
caa ggt cag ctc cag ttc aac ctg cag ggt gcg ctt aag gat tgg agc				697

65/84

Gln	Gly	Gln	Leu	Gln	Phe	Asn	Leu	Gln	Gly	Ala	Leu	Lys	Asp	Trp	Ser		
			180					185					190				
agc	aac	cga	ctg	aag	aat	ttg	gac	tta	cac	tta	gag	att	ttg	gtc	aaa	745	
Ser	Asn	Arg	Leu	Lys	Asn	Leu	Asp	Leu	His	Leu	Glu	Ile	Leu	Val	Lys		
		195					200					205					
gag	gac	aga	tac	tcc	agg	gta	act	gtc	cag	ccc	gag	aac	ccc	tgt	gac	793	
Glu	Asp	Arg	Tyr	Ser	Arg	Val	Thr	Val	Gln	Pro	Glu	Asn	Pro	Cys	Asp		
		210				215					220						
ccg	ctg	ctc	cgc	tct	cta	cat	gcc	tcg	ctg	ctg	gtg	gta	acc	ctc	aat	841	
Pro	Leu	Leu	Arg	Ser	Leu	His	Ala	Ser	Leu	Leu	Val	Val	Thr	Leu	Asn		
225					230					235					240		
cct	aaa	cac	tgt	cat	cct	tct	tcc	aga	aaa	agg	agg	gcg	gcc	atc	tct	889	
Pro	Lys	His	Cys	His	Pro	Ser	Ser	Arg	Lys	Arg	Arg	Ala	Ala	Ile	Ser		
			245						250					255			
gtc	ccc	aag	ggc	ttc	tgt	agg	aac	ttc	tgc	cac	cgt	cat	cag	ctg	ttc	937	
Val	Pro	Lys	Gly	Phe	Cys	Arg	Asn	Phe	Cys	His	Arg	His	Gln	Leu	Phe		
			260					265					270				
atc	aac	ttc	cag	gac	ctg	ggc	tgg	cac	aag	tgg	gtc	atc	gcc	cct	aag	985	
Ile	Asn	Phe	Gln	Asp	Leu	Gly	Trp	His	Lys	Trp	Val	Ile	Ala	Pro	Lys		
		275					280					285					
ggg	ttc	atg	gca	aat	tac	tgt	cat	gga	gag	tgc	ccc	ttc	tca	atg	acc	1033	
Gly	Phe	Met	Ala	Asn	Tyr	Cys	His	Gly	Glu	Cys	Pro	Phe	Ser	Met	Thr		
		290				295					300						
acg	tat	tta	aat	agt	tcc	aat	tat	gct	ttc	atg	cag	gct	ctg	atg	cat	1081	
Thr	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ser	Asn	Tyr	Ala	Phe	Met	Gln	Ala	Leu	Met	His		
305					310					315				320			
atg	gct	gac	ccc	aag	gtc	ccc	aag	gct	gtc	tgt	gtc	ccc	acc	aag	ctc	1129	
Met	Ala	Asp	Pro	Lys	Val	Pro	Lys	Ala	Val	Cys	Val	Pro	Thr	Lys	Leu		
				325				330					335				
tcg	ccc	atc	tcc	atg	ctc	tat	cag	gat	agt	gat	aag	aac	gtc	att	ctc	1177	
Ser	Pro	Ile	Ser	Met	Leu	Tyr	Gln	Asp	Ser	Asp	Lys	Asn	Val	Ile	Leu		
			340				345						350				

66/84

cga cat tat gaa gac atg gta gtc gat gag tgt ggg tgt ggg 1219  
 Arg His Tyr Glu Asp Met Val Val Asp Glu Cys Gly Cys Gly  
           355                          360                          365

tagtctcggg actaggctag gagtgtgctt agggtaaatac ctttaataaaa actaccaccc 1279

c 1280

<210> 32

<211> 366

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Met Gln Pro Tyr Gln Arg Leu Leu Ala Leu Gly Phe Leu Leu Leu Thr  
       1                          5                          10                          15

Leu Pro Trp Gly Gln Thr Ser Glu Phe Gln Asp Ser Asp Leu Leu Gln  
                           20                          25                          30

Phe Leu Gly Leu Glu Lys Ala Pro Ser Pro His Arg Phe Gln Pro Val  
                           35                          40                          45

Pro Arg Val Leu Arg Lys Ile Ile Arg Ala Arg Glu Ala Ala Ala Ala  
           50                          55                          60

Ser Gly Ala Ser Gln Asp Leu Cys Tyr Val Lys Glu Leu Gly Val Arg  
       65                          70                          75                          80

Gly Asn Leu Leu Gln Leu Leu Pro Asp Gln Gly Phe Phe Leu Asn Thr  
                           85                          90                          95

Gln Lys Pro Phe Gln Asp Gly Ser Cys Leu Gln Lys Val Leu Tyr Phe  
                           100                          105                          110

Asn Leu Ser Ala Ile Lys Glu Lys Ala Lys Leu Thr Met Ala Gln Leu  
           115                          120                          125

Thr Leu Asp Leu Gly Pro Arg Ser Tyr Tyr Asn Leu Arg Pro Glu Leu  
       130                          135                          140

Val Val Ala Leu Ser Val Val Gln Asp Arg Gly Val Trp Gly Arg Ser

67/84

145		150		155		160									
His	Pro	Lys	Val	Gly	Arg	Leu	Leu	Phe	Leu	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	Pro
				165					170					175	
Gln	Gly	Gln	Leu	Gln	Phe	Asn	Leu	Gln	Gly	Ala	Leu	Lys	Asp	Trp	Ser
			180					185					190		
Ser	Asn	Arg	Leu	Lys	Asn	Leu	Asp	Leu	His	Leu	Glu	Ile	Leu	Val	Lys
		195					200					205			
Glu	Asp	Arg	Tyr	Ser	Arg	Val	Thr	Val	Gln	Pro	Glu	Asn	Pro	Cys	Asp
	210					215					220				
Pro	Leu	Leu	Arg	Ser	Leu	His	Ala	Ser	Leu	Leu	Val	Val	Thr	Leu	Asn
225					230					235					240
Pro	Lys	His	Cys	His	Pro	Ser	Ser	Arg	Lys	Arg	Arg	Ala	Ala	Ile	Ser
			245						250					255	
Val	Pro	Lys	Gly	Phe	Cys	Arg	Asn	Phe	Cys	His	Arg	His	Gln	Leu	Phe
			260					265					270		
Ile	Asn	Phe	Gln	Asp	Leu	Gly	Trp	His	Lys	Trp	Val	Ile	Ala	Pro	Lys
		275					280					285			
Gly	Phe	Met	Ala	Asn	Tyr	Cys	His	Gly	Glu	Cys	Pro	Phe	Ser	Met	Thr
	290					295					300				
Thr	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ser	Asn	Tyr	Ala	Phe	Met	Gln	Ala	Leu	Met	His
305				310						315				320	
Met	Ala	Asp	Pro	Lys	Val	Pro	Lys	Ala	Val	Cys	Val	Pro	Thr	Lys	Leu
			325						330				335		
Ser	Pro	Ile	Ser	Met	Leu	Tyr	Gln	Asp	Ser	Asp	Lys	Asn	Val	Ile	Leu
		340						345					350		
Arg	His	Tyr	Glu	Asp	Met	Val	Val	Asp	Glu	Cys	Gly	Cys	Gly		
	355						360					365			

&lt;400&gt; 33

agg gaa cag ttg aca ttg gcc cag ctg ggc ctg gac ttg ggg ccc aat 438



69/84

Arg	Glu	Gln	Leu	Thr	Leu	Ala	Gln	Leu	Gly	Leu	Asp	Leu	Gly	Pro	Asn		
120						125					130						
tct	tac	tat	aac	ctg	gga	cca	gag	ctg	gaa	ctg	gct	ctg	ttc	ctg	gtt	486	
Ser	Tyr	Tyr	Asn	Leu	Gly	Pro	Glu	Leu	Glu	Leu	Ala	Leu	Phe	Leu	Val		
135					140					145					150		
cag	gag	cct	cat	gtg	tgg	ggc	cag	acc	acc	cct	aag	cca	ggg	aaa	atg	534	
Gln	Glu	Pro	His	Val	Trp	Gly	Gln	Thr	Thr	Pro	Lys	Pro	Gly	Lys	Met		
				155					160						165		
ttt	gtg	ttg	cgg	tca	gtc	cca	tgg	cca	caa	ggg	gct	gtt	cac	ttc	aac	582	
Phe	Val	Leu	Arg	Ser	Val	Pro	Trp	Pro	Gln	Gly	Ala	Val	His	Phe	Asn		
			170					175						180			
ctg	ctg	gat	gta	gct	aag	gat	tgg	aat	gac	aac	ccc	cgg	aaa	aat	ttc	630	
Leu	Leu	Asp	Val	Ala	Lys	Asp	Trp	Asn	Asp	Asn	Pro	Arg	Lys	Asn	Phe		
		185					190					195					
ggg	tta	ttc	ctg	gag	ata	ctg	gtc	aaa	gaa	gat	aga	gac	tca	ggg	gtg	678	
Gly	Leu	Phe	Leu	Glu	Ile	Leu	Val	Lys	Glu	Asp	Arg	Asp	Ser	Gly	Val		
	200					205					210						
aat	ttt	cag	cct	gaa	gac	acc	tgt	gcc	aga	cta	aga	tgc	tcc	ctt	cat	726	
Asn	Phe	Gln	Pro	Glu	Asp	Thr	Cys	Ala	Arg	Leu	Arg	Cys	Ser	Leu	His		
215				220						225					230		
gct	tcc	ctg	ctg	gtg	gtg	act	ctc	aac	cct	gat	cag	tgc	cac	cct	tct	774	
Ala	Ser	Leu	Leu	Val	Val	Thr	Leu	Asn	Pro	Asp	Gln	Cys	His	Pro	Ser		
				235					240					245			
cgg	aaa	agg	aga	gca	gcc	atc	cct	gtc	ccc	aag	ctt	tct	tgt	aag	aac	822	
Arg	Lys	Arg	Arg	Ala	Ala	Ile	Pro	Val	Pro	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Asn		
			250					255					260				
ctc	tgc	cac	cgt	cac	cag	cta	ttc	att	aac	ttc	cgg	gac	ctg	ggg	tgg	870	
Leu	Cys	His	Arg	His	Gln	Leu	Phe	Ile	Asn	Phe	Arg	Asp	Leu	Gly	Trp		
		265				270						275					
cac	aag	tgg	atc	att	gcc	ccc	aag	ggg	ttc	atg	gca	aat	tac	tgc	cat	918	
His	Lys	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Gly	Phe	Met	Ala	Asn	Tyr	Cys	His		
	280					285					290						

70/84

gga gag tgt ccc ttc tca ctg acc atc tct ctc aac agc tcc aat tat 966  
 Gly Glu Cys Pro Phe Ser Leu Thr Ile Ser Leu Asn Ser Ser Asn Tyr  
 295 300 305 310

gct ttc atg caa gcc ctg atg cat gcc gtt gac cca gag atc ccc cag 1014  
 Ala Phe Met Gln Ala Leu Met His Ala Val Asp Pro Glu Ile Pro Gln  
 315 320 325

gct gtg tgt atc ccc acc aag ctg tct ccc att tcc atg ctc tac cag 1062  
 Ala Val Cys Ile Pro Thr Lys Leu Ser Pro Ile Ser Met Leu Tyr Gln  
 330 335 340

gac aat aat gac aat gtc att cta cga cat tat gaa gac atg gta gtc 1110  
 Asp Asn Asn Asp Asn Val Ile Leu Arg His Tyr Glu Asp Met Val Val  
 345 350 355

gat gaa tgt ggg tgt ggg taggatgtca gaaatgggaa tagaaggagt 1158  
 Asp Glu Cys Gly Cys Gly  
 360

gttcttaggg taaatctttt aataaaacta cctatctggt ttatgaccac ttagatcgaa 1218

atgtca 1224

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 364

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 34

Met Leu Arg Phe Leu Pro Asp Leu Ala Phe Ser Phe Leu Leu Ile Leu  
 1 5 10 15

Ala Leu Gly Gln Ala Val Gln Phe Gln Glu Tyr Val Phe Leu Gln Phe  
 20 25 30

Leu Gly Leu Asp Lys Ala Pro Ser Pro Gln Lys Phe Gln Pro Val Pro  
 35 40 45

Tyr Ile Leu Lys Lys Ile Phe Gln Asp Arg Glu Ala Ala Ala Thr Thr  
 50 55 60

71/84

Gly Val Ser Arg Asp Leu Cys Tyr Val Lys Glu Leu Gly Val Arg Gly  
 65 70 75 80

Asn Val Leu Arg Phe Leu Pro Asp Gln Gly Phe Phe Leu Tyr Pro Lys  
 85 90 95

Lys Ile Ser Gln Ala Ser Ser Cys Leu Gln Lys Leu Leu Tyr Phe Asn  
 100 105 110

Leu Ser Ala Ile Lys Glu Arg Glu Gln Leu Thr Leu Ala Gln Leu Gly  
 115 120 125

Leu Asp Leu Gly Pro Asn Ser Tyr Tyr Asn Leu Gly Pro Glu Leu Glu  
 130 135 140

Leu Ala Leu Phe Leu Val Gln Glu Pro His Val Trp Gly Gln Thr Thr  
 145 150 155 160

Pro Lys Pro Gly Lys Met Phe Val Leu Arg Ser Val Pro Trp Pro Gln  
 165 170 175

Gly Ala Val His Phe Asn Leu Leu Asp Val Ala Lys Asp Trp Asn Asp  
 180 185 190

Asn Pro Arg Lys Asn Phe Gly Leu Phe Leu Glu Ile Leu Val Lys Glu  
 195 200 205

Asp Arg Asp Ser Gly Val Asn Phe Gln Pro Glu Asp Thr Cys Ala Arg  
 210 215 220

Leu Arg Cys Ser Leu His Ala Ser Leu Leu Val Val Thr Leu Asn Pro  
 225 230 235 240

Asp Gln Cys His Pro Ser Arg Lys Arg Arg Ala Ala Ile Pro Val Pro  
 245 250 255

Lys Leu Ser Cys Lys Asn Leu Cys His Arg His Gln Leu Phe Ile Asn  
 260 265 270

Phe Arg Asp Leu Gly Trp His Lys Trp Ile Ile Ala Pro Lys Gly Phe  
 275 280 285

Met Ala Asn Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro Phe Ser Leu Thr Ile Ser

72/84

290	295	300	
Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Ala Phe Met Gln Ala Leu Met His Ala Val			
305	310	315	320
Asp Pro Glu Ile Pro Gln Ala Val Cys Ile Pro Thr Lys Leu Ser Pro			
	325	330	335
Ile Ser Met Leu Tyr Gln Asp Asn Asn Asp Asn Val Ile Leu Arg His			
	340	345	350
Tyr Glu Asp Met Val Val Asp Glu Cys Gly Cys Gly			
	355	360	
<210> 35			
<211> 1248			
<212> DNA			
<213> Mus musculus			
<220>			
<221> CDS			
<222> (32).. (1003)			
<400> 35			
agtggatccc cccggctgca ggaattccgg g atg gat cct cga acc tgg cta			52
	Met Asp Pro Arg Thr Trp Leu		
	1	5	
agc ttc caa ggg cct cca ggt ggg cct gga atc gga cca ggc tca gag			100
Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Gly Pro Gly Ile Gly Pro Gly Ser Glu			
	10	15	20
gta ttg ggg atc tcc cca tgt ccg ccc gca tac gag ttc tgc gga ggg			148
Val Leu Gly Ile Ser Pro Cys Pro Pro Ala Tyr Glu Phe Cys Gly Gly			
	25	30	35
atg gca tac tgt gga cct cag gtt ggt ctg ggc cta gtc ccc caa gtt			196
Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val Gly Leu Gly Leu Val Pro Gln Val			
	40	45	50
ggc gtg gag act ttg cag cct gag ggc cag gca gga gca cga gtg gaa			244

73/84

Gly Val Glu Thr Leu Gln Pro Glu Gly Gln Ala Gly Ala Arg Val Glu	
60 65 70	
agc aac tca gag gga acc tcc tct gag ccc tgt gcc gac cgc ccc aat	292
Ser Asn Ser Glu Gly Thr Ser Ser Glu Pro Cys Ala Asp Arg Pro Asn	
75 80 85	
gcc gtg aag ttg gag aag gtg gaa cca act ccc gag gag tcc cag gac	340
Ala Val Lys Leu Glu Lys Val Glu Pro Thr Pro Glu Glu Ser Gln Asp	
90 95 100	
atg aaa gcc ctg cag aag gag cta gaa cag ttt gcc aag ctg ctg aag	388
Met Lys Ala Leu Gln Lys Glu Leu Glu Gln Phe Ala Lys Leu Leu Lys	
105 110 115	
cag aag agg atc acc ttg ggg tac acc cag gcc gac gtg ggg ctc acc	436
Gln Lys Arg Ile Thr Leu Gly Tyr Thr Gln Ala Asp Val Gly Leu Thr	
120 125 130 135	
ctg ggc gtt ctc ttt gga aag gtg ttc agc cag acc acc atc tgt cgc	484
Leu Gly Val Leu Phe Gly Lys Val Phe Ser Gln Thr Thr Ile Cys Arg	
140 145 150	
ttc gag gcc ttg cag ctc agc ctt aag aac atg tgt aag ctg cgg ccc	532
Phe Glu Ala Leu Gln Leu Ser Leu Lys Asn Met Cys Lys Leu Arg Pro	
155 160 165	
ctg ctg gag aag tgg gtg gag gaa gcc gac aac aat gag aac ctt cag	580
Leu Leu Glu Lys Trp Val Glu Glu Ala Asp Asn Asn Glu Asn Leu Gln	
170 175 180	
gag ata tgc aaa tcg gag acc ctg gtg cag gcc cgg aag aga aag cga	628
Glu Ile Cys Lys Ser Glu Thr Leu Val Gln Ala Arg Lys Arg Lys Arg	
185 190 195	
act agc att gag aac cgt gtg agg tgg agt ctg gag acc atg ttt ctg	676
Thr Ser Ile Glu Asn Arg Val Arg Trp Ser Leu Glu Thr Met Phe Leu	
200 205 210 215	
aag tgc ccg aag ccc tcc cta cag cag atc act cac atc gcc aat cag	724
Lys Cys Pro Lys Pro Ser Leu Gln Gln Ile Thr His Ile Ala Asn Gln	
220 225 230	

74/84

ctt ggg cta gag aag gat gtg gtt cga gta tgg ttc tgt aac cgg cgc 772  
 Leu Gly Leu Glu Lys Asp Val Val Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg  
 235 240 245

cag aag ggc aaa aga tca agt att gag tat tcc caa cga gaa gag tat 820  
 Gln Lys Gly Lys Arg Ser Ser Ile Glu Tyr Ser Gln Arg Glu Glu Tyr  
 250 255 260

gag gct aca ggg aca cct ttc cca ggg ggg gct gta tcc ttt cct ctg 868  
 Glu Ala Thr Gly Thr Pro Phe Pro Gly Gly Ala Val Ser Phe Pro Leu  
 265 270 275

ccc cca ggt ccc cac ttt ggc acc cca ggc tat gga agc ccc cac ttc 916  
 Pro Pro Gly Pro His Phe Gly Thr Pro Gly Tyr Gly Ser Pro His Phe  
 280 285 290 295

acc aca ctc tac tca gtc cct ttt cct gag ggc gag gcc ttt ccc tct 964  
 Thr Thr Leu Tyr Ser Val Pro Phe Pro Glu Gly Glu Ala Phe Pro Ser  
 300 305 310

gtt ccc gtc act gct ctg ggc tct ccc atg cat tca aac tgaggcacca 1013  
 Val Pro Val Thr Ala Leu Gly Ser Pro Met His Ser Asn  
 315 320

gccctccctg gggatgctgt gagccaaggc aaggagggtg gacaagagaa cctggagctt 1073

tgggggttaaa ttcttttact gaggagggtat taaaagcaca acaggggttg ggggtgggat 1133

ggggaaagaa gctcagtgat gctgttgatc aggagcctgg cctgtctgtc actcatcatt 1193

ttgttcttaa ataaagactg ggacacacag taataaaaaaa aaaaaaaaac tcgag 1248

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 324

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 36

Met Asp Pro Arg Thr Trp Leu Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Gly Pro  
 1 5 10 15

Gly Ile Gly Pro Gly Ser Glu Val Leu Gly Ile Ser Pro Cys Pro Pro

75/84

20	25	30
Ala Tyr Glu Phe Cys Gly Gly Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val Gly		
35	40	45
Leu Gly Leu Val Pro Gln Val Gly Val Glu Thr Leu Gln Pro Glu Gly		
50	55	60
Gln Ala Gly Ala Arg Val Glu Ser Asn Ser Glu Gly Thr Ser Ser Glu		
65	70	75
Pro Cys Ala Asp Arg Pro Asn Ala Val Lys Leu Glu Lys Val Glu Pro		
85	90	95
Thr Pro Glu Glu Ser Gln Asp Met Lys Ala Leu Gln Lys Glu Leu Glu		
100	105	110
Gln Phe Ala Lys Leu Leu Lys Gln Lys Arg Ile Thr Leu Gly Tyr Thr		
115	120	125
Gln Ala Asp Val Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Phe Gly Lys Val Phe		
130	135	140
Ser Gln Thr Thr Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu Ser Leu Lys		
145	150	155
Asn Met Cys Lys Leu Arg Pro Leu Leu Glu Lys Trp Val Glu Glu Ala		
165	170	175
Asp Asn Asn Glu Asn Leu Gln Glu Ile Cys Lys Ser Glu Thr Leu Val		
180	185	190
Gln Ala Arg Lys Arg Lys Arg Thr Ser Ile Glu Asn Arg Val Arg Trp		
195	200	205
Ser Leu Glu Thr Met Phe Leu Lys Cys Pro Lys Pro Ser Leu Gln Gln		
210	215	220
Ile Thr His Ile Ala Asn Gln Leu Gly Leu Glu Lys Asp Val Val Arg		
225	230	235
Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Gly Lys Arg Ser Ser Ile Glu		
245	250	255

76/84

Tyr Ser Gln Arg Glu Glu Tyr Glu Ala Thr Gly Thr Pro Phe Pro Gly  
 260 265 270

Gly Ala Val Ser Phe Pro Leu Pro Pro Gly Pro His Phe Gly Thr Pro  
 275 280 285

Gly Tyr Gly Ser Pro His Phe Thr Thr Leu Tyr Ser Val Pro Phe Pro  
 290 295 300

Glu Gly Glu Ala Phe Pro Ser Val Pro Val Thr Ala Leu Gly Ser Pro  
 305 310 315 320

Met His Ser Asn

<210> 37

<211> 1371

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (43)..(1122)

<400> 37

ctcatttcac caggcccccg gcttggggcg ccttccttcc cc atg gcg gga cac 54  
 Met Ala Gly His  
 1

ctg gct tcg gat ttc gcc ttc tcg ccc cct cca ggt ggt gga ggt gat 102  
 Leu Ala Ser Asp Phe Ala Phe Ser Pro Pro Pro Gly Gly Gly Gly Asp  
 5 10 15 20

ggg cca ggg ggg ccg gag ccg ggc tgg gtt gat cct cgg acc tgg cta 150  
 Gly Pro Gly Gly Pro Glu Pro Gly Trp Val Asp Pro Arg Thr Trp Leu  
 25 30 35

agc ttc caa ggc cct cct gga ggg cca gga atc ggg ccg ggg gtt ggg 198  
 Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Gly Pro Gly Ile Gly Pro Gly Val Gly  
 40 45 50



77/84

cca ggc tct gag gtg tgg ggg att ccc cca tgc ccc ccg ccg tat gag	246
Pro Gly Ser Glu Val Trp Gly Ile Pro Pro Cys Pro Pro Pro Tyr Glu	
55 60 65	
ttc tgt ggg ggg atg gcg tac tgt ggg ccc cag gtt gga gtg ggg cta	294
Phe Cys Gly Gly Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val Gly Val Gly Leu	
70 75 80	
gtg ccc caa ggc ggc ttg gag acc tct cag cct gag ggc gaa gca gga	342
Val Pro Gln Gly Gly Leu Glu Thr Ser Gln Pro Glu Gly Glu Ala Gly	
85 90 95 100	
gtc ggg gtg gag agc aac tcc gat ggg gcc tcc ccg gag ccc tgc acc	390
Val Gly Val Glu Ser Asn Ser Asp Gly Ala Ser Pro Glu Pro Cys Thr	
105 110 115	
gtc acc cct ggt gcc gtg aag ctg gag aag gag aag ctg gag caa aac	438
Val Thr Pro Gly Ala Val Lys Leu Glu Lys Glu Lys Leu Glu Gln Asn	
120 125 130	
ccg gag gag tcc cag gac atc aaa gct ctg cag aaa gaa ctc gag caa	486
Pro Glu Glu Ser Gln Asp Ile Lys Ala Leu Gln Lys Glu Leu Glu Gln	
135 140 145	
ttt gcc aag ctc ctg aag cag aag agg atc acc ctg gga tat aca cag	534
Phe Ala Lys Leu Leu Lys Gln Lys Arg Ile Thr Leu Gly Tyr Thr Gln	
150 155 160	
gcc gat gtg ggg ctc acc ctg ggg gtt cta ttt ggg aag gta ttc agc	582
Ala Asp Val Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Phe Gly Lys Val Phe Ser	
165 170 175 180	
caa acg acc atc tgc cgc ttt gag gct ctg cag ctt agc ttc aag aac	630
Gln Thr Thr Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu Ser Phe Lys Asn	
185 190 195	
atg tgt aag ctg cgg ccc ttg ctg cag aag tgg gtg gag gaa gct gac	678
Met Cys Lys Leu Arg Pro Leu Leu Gln Lys Trp Val Glu Glu Ala Asp	
200 205 210	
aac aat gaa aat ctt cag gag ata tgc aaa gca gaa acc ctc gtg cag	726
Asn Asn Glu Asn Leu Gln Glu Ile Cys Lys Ala Glu Thr Leu Val Gln	

78/84

215	220	225	
gcc cga aag aga aag cga acc agt atc gag aac cga gtg aga ggc aac			774
Ala Arg Lys Arg Lys Arg Thr Ser Ile Glu Asn Arg Val Arg Gly Asn			
230	235	240	
ctg gag aat ttg ttc ctg cag tgc ccg aaa ccc aca ctg cag cag atc			822
Leu Glu Asn Leu Phe Leu Gln Cys Pro Lys Pro Thr Leu Gln Gln Ile			
245	250	255	260
agc cac atc gcc cag cag ctt ggg ctc gag aag gat gtg gtc cga gtg			870
Ser His Ile Ala Gln Gln Leu Gly Leu Glu Lys Asp Val Val Arg Val			
265	270	275	
tgg ttc tgt aac cgg cgc cag aag ggc aag cga tca agc agc gac tat			918
Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Gly Lys Arg Ser Ser Ser Asp Tyr			
280	285	290	
gca caa cga gag gat ttt gag gct gct ggg tct cct ttc tca ggg gga			966
Ala Gln Arg Glu Asp Phe Glu Ala Ala Gly Ser Pro Phe Ser Gly Gly			
295	300	305	
cca gtg tcc ttt cct ctg gcc cca ggg ccc cat ttt ggt acc cca ggc			1014
Pro Val Ser Phe Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Phe Gly Thr Pro Gly			
310	315	320	
tat ggg agc cct cac ttc act gca ctg tac tcc tcg gtc cct ttc cct			1062
Tyr Gly Ser Pro His Phe Thr Ala Leu Tyr Ser Ser Val Pro Phe Pro			
325	330	335	340
gag ggg gaa gcc ttt ccc cct gtc tct gtc acc act ctg ggc tct ccc			1110
Glu Gly Glu Ala Phe Pro Pro Val Ser Val Thr Thr Leu Gly Ser Pro			
345	350	355	
atg cat tca aac tgaggtgcct gcccttctag gaatggggga cagggggagg			1162
Met His Ser Asn			
360			
ggaggagcta gggaaagaaa acctggagtt tgtgccaggg tttttggatt aagttcttca			1222
ttcactaagg aaggaattgg gaacacaaag ggtgggggca ggggagtttg gggcaactgg			1282
ttggagggaa ggtgaagttc aatgatgctc ttgattttta tcccacatca tgtatcactt			1342

79/84

ttttcttaaa taaagaagct tgggacaca

1371

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 360

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 38

Met Ala Gly His Leu Ala Ser Asp Phe Ala Phe Ser Pro Pro Pro Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Asp Gly Pro Gly Gly Pro Glu Pro Gly Trp Val Asp Pro  
20 25 30

Arg Thr Trp Leu Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Gly Pro Gly Ile Gly  
35 40 45

Pro Gly Val Gly Pro Gly Ser Glu Val Trp Gly Ile Pro Pro Cys Pro  
50 55 60

Pro Pro Tyr Glu Phe Cys Gly Gly Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val  
65 70 75 80

Gly Val Gly Leu Val Pro Gln Gly Gly Leu Glu Thr Ser Gln Pro Glu  
85 90 95

Gly Glu Ala Gly Val Gly Val Glu Ser Asn Ser Asp Gly Ala Ser Pro  
100 105 110

Glu Pro Cys Thr Val Thr Pro Gly Ala Val Lys Leu Glu Lys Glu Lys  
115 120 125

Leu Glu Gln Asn Pro Glu Glu Ser Gln Asp Ile Lys Ala Leu Gln Lys  
130 135 140

Glu Leu Glu Gln Phe Ala Lys Leu Leu Lys Gln Lys Arg Ile Thr Leu  
145 150 155 160

Gly Tyr Thr Gln Ala Asp Val Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Phe Gly  
165 170 175

80/84

Lys Val Phe Ser Gln Thr Thr Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu  
 180 185 190

Ser Phe Lys Asn Met Cys Lys Leu Arg Pro Leu Leu Gln Lys Trp Val  
 195 200 205

Glu Glu Ala Asp Asn Asn Glu Asn Leu Gln Glu Ile Cys Lys Ala Glu  
 210 215 220

Thr Leu Val Gln Ala Arg Lys Arg Lys Arg Thr Ser Ile Glu Asn Arg  
 225 230 235 240

Val Arg Gly Asn Leu Glu Asn Leu Phe Leu Gln Cys Pro Lys Pro Thr  
 245 250 255

Leu Gln Gln Ile Ser His Ile Ala Gln Gln Leu Gly Leu Glu Lys Asp  
 260 265 270

Val Val Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Gly Lys Arg Ser  
 275 280 285

Ser Ser Asp Tyr Ala Gln Arg Glu Asp Phe Glu Ala Ala Gly Ser Pro  
 290 295 300

Phe Ser Gly Gly Pro Val Ser Phe Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Phe  
 305 310 315 320

Gly Thr Pro Gly Tyr Gly Ser Pro His Phe Thr Ala Leu Tyr Ser Ser  
 325 330 335

Val Pro Phe Pro Glu Gly Glu Ala Phe Pro Pro Val Ser Val Thr Thr  
 340 345 350

Leu Gly Ser Pro Met His Ser Asn  
 355 360

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 39

agggtctgct actgagatgc tctg

24

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 40

aggcaggtct tcagaggaag ggcg

24

<210> 41

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 41

cgggctgtag acctgtctgc attctg

26

<210> 42

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 42

ggtccttctg tctcatcctc gagagt

26

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 43

accaaggtca ccgcatccaa

20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 44

cttcaccaag atttcgatg

20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 45

gaatggtgga ctagcttttg

20

<210> 46

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 46	
tgccatgaat gtcgatatgc ag	22
<210> 47	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence:primer	
<400> 47	
ccgcggaaag tcaagagatt gggtgg	26
<210> 48	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence:primer	
<400> 48	
gcggccgcct ttacgggtca cgagggtcac	30
<210> 49	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence:primer	
<400> 49	
tgtggccagt gtttggttct ggcggg	26
<210> 50	
<211> 26	

84/84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 50

ctcgaggact cgccattcta gccaaag

26



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002842

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12Q1/68, C12Q1/02, C12N5/10, A01K67/027, G01N33/50, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12Q1/68, C12Q1/02, C12N5/10, A01K67/027, G01N33/50, G01N33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus, PUBMED, WPI

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u>	WO 2002/061033 A1 (YISSUM RES DEV CO HEBREW UNIV JERUSALEM), 08 August, 2002 (08.08.02), & US 20020127715 A1 & EP 1379624 A2 & AU 2002247875 A1 & JP 2004-520046 A	<u>65-69</u> 44-57, 70
<u>X</u> <u>Y</u>	JP 2002-65261 A (Kabushiki Kaisha Mitsubishi Kagaku Seimei Kagaku Kenkyusho), 05 March, 2002 (05.03.02), (Family: none)	<u>65-69</u> 44-57, 70



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 May, 2005 (31.05.05)

Date of mailing of the international search report

14 June, 2005 (14.06.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002842

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	JP 2003-111588 A (Geron Corp.), 15 April, 2003 (15.04.03), & WO 2001/51616 A2 & AU 20011112 A & AU 200126395 A & US 2002/0019046 A1 & US 2002/0022268 A1 & US 2002/0072117 A1 & US 2002/0081724 A1 & US 2002/0090723 A1 & AU 751321 B & US 2002/0137204 A1 & US 2002/0151053 A1 & EP 1250420 A2 & US 20020168766 A1 & US 20030017589 A1 & CN 1416462 A & JP 2003-530828 A & US 6642048 B2 & US 6667176 B1 & AU 2002301213 A1 & AU 2002301213 A1 & US 20040235159 A1 & US 20050095707 A1	<u>65-69</u> 44-57, 70
Y	JP 2003-523166 A (GAMIDA CELL LTD.), 05 August, 2003 (05.08.03), & WO 2000/18885 A1 & AU 9952998 A & EP 117762 A1 & BR 9914465 A & US 20020114789 A1 & ZA 200102073 A & US 20020159981 A1 & JP 2003523166 A & AU 770896 B2 & AU 2004201623 A1 & US 20050031595 A1 & US 6887704 B2	44-57, 70
Y	JP 2003-9854 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 14 January, 2003 (14.01.03), (Family: none)	44-57, 70
Y	WO 2002/097090 A1 (Nobuya YAMANAKA), 05 December, 2002 (05.12.02), & EP 1403366 A1 & US 20040137460 A1 & AU 2002306374 A1	50-54, 56, 57
E, X	JP 2005-95027 A (Kabushiki Kaisha Ripuroseru), 14 April, 2005 (14.04.05), (Family: none)	65-69

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002842

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 17-21, 43, 58-60  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
Concerning the substances or cells selected by using the screening methods as set forth in claims 17 to 21, 43 and 58 to 60, it is completely unknown what specific substances are included, as the corresponding substances, in the scopes thereof and what are not. Namely, (continued to extra sheet)
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002842

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

these claims are described in an extremely unclear manner. Such being the case, no meaningful opinion can be presented on the novelty, inventive step or industrial applicability of inventions as set forth in the above claims and claims depending thereon.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12Q1/68, C12Q1/02, C12N5/10, A01K67/027, G01N33/50, G01N33/15

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12Q1/68, C12Q1/02, C12N5/10, A01K67/027, G01N33/50, G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus, PUBMED, WPI

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO 2002/061033 A1 (YISSUM RES DEV CO HEBREW UNIV JERUSALEM) 2002.08.08 & US 20020127715 A1 & EP 1379624 A2 & AU 2002247875 A1 & JP 2004-520046 A	65-69 44-57, 70
X Y	JP 2002-65261 A (株式会社三菱化学生命科学研究 所) 2002.03.05 ファミリーなし	65-69 44-57, 70

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31.05.2005

国際調査報告の発送日

14.6.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

9453

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	J P 2003-111588 A (ジェロン・コーポレーショ ン) 2003.04.15 & WO 2001/51616 A2 & AU 20011112 A & AU 200126395 A & US 2002/0019046 A1 & US 2002/0022268 A1 & US 2002/0072117 A1 & US 2002/0081724 A1 & US 2002/0090723 A1 & AU 751321 B & US 2002/0137204 A1 & US 2002/0151053 A1 & EP 1250420 A2 & US 20020168766 A1 & US 20030017589 A1 & CN 1416462 A & JP 2003-530828 A & US 6642048 B2 & US 6667176 B1 & AU 2002301213 A1 & AU 2002301213 A1 & US 20040235159 A1 & US 20050095707 A1	65-69 44-57, 70
Y	J P 2003-523166 A (ガミダ セル リミテッド) 2003.08.05 & WO 2000/18885 A1 & AU 9952998 A & EP 1117762 A1 & BR 9914465 A & US 20020114789 A1 & ZA 200102073 A & US 20020159981 A1 & JP 2003523166 A & AU 770896 B2 & AU 2004201623 A1 & US 20050031595 A1 & US 6887704 B2	44-57, 70
Y	J P 2003-9854 A (協和発酵工業株式会社) 2003.01.14 ファミリーなし	44-57, 70
Y	WO 2002/097090 A1 (山中伸弥) 2002.12.05 & EP 1403366 A1 & US 20040137460 A1 & AU 2002306374 A1	50-54, 56, 57
EX	J P 2005-95027 A (株式会社リプロセル) 2005.04.14 ファミリーなし	65-69

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☒ 請求の範囲 17-21, 43, 58-60 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
請求の範囲 17-21, 43, 58-60 に記載のスクリーニング方法を用いて選択された物質または細胞については、物として具体的にどのような物が包含され、どのような物が包含されないのかが全く不明であって、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。したがって、前記請求の範囲及びそれを引用する各請求の範囲に記載された発明に係る新規性、進歩性、産業上の利用可能性についての有意義な見解を示すことができない。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。